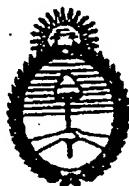


OFFICIAL FILING CERTIFICATE

BEST AVAILABLE COPY



Instituto Nacional de la Propiedad Industrial

PATENTE DE INVENCION

Buenos Aires

p 040101441

Bajo el Acta N°.....

Se ha dado ingreso a una solicitud de PATENTE DE INVENCION

IN.P.I.

PM
28 1153
Año de presentación
2004

NZAS-0022060

Memoria Descriptiva

de la

Patente de Invención

Sobre
"FOSFOLIPASA Y METODO PARA PRODUCIRLA"

Solicitada por:

NOVOZYMES A/S * CHR. HANSEN A/S,
residentes en Krogsbovej 36, DK-2880
Bagsvaerd * Boege Alle 10-12 DK-2970
Hoersholm, DINAMARCA.

210909
PLC/RF

NZAS-0022061

FOSFOLIPASA Y METODO PARA PRODUCIRLA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para hidrolizar un fosfolípido, a un método para producir una fosfolipasa, a un método para preparar queso, y a una fosfolipasa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Soragni, E., et al (2001) EMBO J. 20 : 5079-5090, describe una fosfolipasa (TbSP1) de *Tuber borchii* y la secuencia nucleotídica de un ADNc de un gen que la codifica. Las siguientes secuencias peptídicas han sido publicadas en las fuentes que se indican, y derivan del organismo de la fuente que se indica:

- COGEME Phytopathogenic Fungi and Oomycete EST Database, Unisequence ID: VD0100C34, *Verticillium dahliae*.
- NCBI Protein database, gi: 18307435, *Neurospora crassa*.
- NCBI Protein database, gi: 16519372, *Helicosporum sp. HN1*
- WO 0056762, SEC ID NO: 5954, *Aspergillus oryzae*.
- TREMBL Protein database, EAA28927, *Neurospora crassa*

La Patente Norteamericana 6399121 describe el uso de fosfolipasa para la elaboración del queso.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Los inventores han analizado datos de secuencias conocidas para las fosfolipasas A2, del Grupo XIII fungal, y tienen secuencias adicionales identificadas, ya sea de los datos de la secuencia publicada u obtenidos por rastreo de las secuencias relevantes a partir de fuentes naturales. Mediante la expresión de genes que codifican las fosfolipasas A2 del grupo XIII fungal en un organismo huésped apropiado, se descubrió que las secuencias expresadas consisten en un péptido de núcleo acoplado a una secuencia peptídica en el lado terminal N o C, o en ambos, y que la expresión del gen en un organismo huésped

A.F.
210909

apropiado puede conducir a la disociación del péptido expresado para obtener el péptido núcleo sin ninguna extensión peptídica en el lado terminal N- o C-. Los inventores descubrieron además que el péptido del núcleo sin ninguna extensión peptídica tiene una actividad de fosfolipasa significativamente superior a la del péptido de núcleo ligado a las extensiones del péptido. Finalmente, hallaron que el péptido del núcleo descubierto mediante este método es de longitud y secuencia similares a las de un péptido maduro conocido de *Helicosporium sp* (Wakatsuki, S. et al. (2001) Biochim. Biophys. Acta 1522: 74-81) de función desconocida, y a la fosfolipasa A2 del Grupo XIII bacteriano, que carece de las extensiones peptídicas distintas de las señales de secreción (Sugiyama, M. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:20051-20058).

Los inventores hallaron adicionalmente que la fosfolipasa comparte la similaridad de secuencia del sitio activo y la conservación del residuo cisteína de la fosfolipasa A2 del Grupo XIII fungal que es útil en la elaboración del queso.

Adicionalmente, los inventores descubrieron y aislarón un gen que codifica una nueva fosfolipasa de *Fusarium venenatum* A3/5, que fue originalmente depositada como *graminearum* ATCC 20334 y recientemente reclasificada como *Fusarium venenatum* por Yoder y Christianson, 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 62-80; y O'Donnell et al., 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 57-67. La fosfolipasa pertenece a las PLA2 del Grupo XIII fungal/bacteriano, definido por Soragni et al., The EMBO Journal, 20 (2001), 5079-5090. Los inventores clonaron también el nuevo gen que codifica fosfolipasa en una cepa de *E. coli*, y usaron el gen clonado para preparar una construcción para expresar el gen de fosfolipasa *Fusarium* en *Aspergillus oryzae*. Los inventores transformaron el *Aspergillus oryzae* con esta construcción, y aislarón la fosfolipasa de las células de *Aspergillus* transformadas.

Por consiguiente, la invención provee un método para producir una fosfolipasa que comprende procesar un péptido fungal expresado de modo de disociar un péptido del extremo C-terminal y/o un péptido de extremo N-terminal para obtener un péptido de núcleo, en el cual dicho péptido de núcleo comprende:

- a) la secuencia de aminoácido proporcionada por los aminoácidos 146-153 de la SEC ID NO: 1, los aminoácidos 87-94 de la SEC ID NO: 3, o los aminoácidos 79-86 de la SEC ID NO: 12; o una secuencia idéntica a cualquiera de estas secuencias de aminoácido excepto por la sustitución de un solo aminoácido con otro aminoácido; y
- b) por lo menos dos residuos cisteína situados en el lado N-terminal de la secuencia proporcionada en a); y
- c) por lo menos dos residuos cisteína situados en el lado C-terminal de la secuencia proporcionada en a).

La invención provee también un método para hidrolizar un fosfolípido con una fosfolipasa de la invención. Además, la invención provee un método para producir queso mediante el contacto de leche de queso o una fracción de leche de queso con una fosfolipasa y producir queso a partir de la leche de queso.

Finalmente, la invención provee fosfolipasa que consiste en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que es por lo menos 80% idéntica a ciertas secuencias especificadas.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra una alineación de las secuencias de aminoácido de las fosfolipasa A2 del Grupo XIII fungal, que muestra los sitios de procesamiento (|) cuando se conocen. El sitio activo de consenso está subrayado. Los residuos cisteína conservados están indicados con | bajo el consenso. La alineación se efectuó con el programa AlignX de Vector NTI suite v8. El algoritmo usado es ClustalW con la matriz blosum62mt2 y los setting de default AlignX.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Péptido expresado

La invención usa un péptido fungal expresado que pertenece a un grupo definido por la similaridad de la secuencia de sitio activo y por la conservación del residuo cisteína usado en la definición del grupo fosfolipasa A2 del Grupo XIII fungal/bacteriano efectuado por Soragni, E., et al. (2001) EMBO J. 20: 5079-5090. El péptido es fungal, es decir, derivado de *Tuber*, *Verticillium*, *Neurospora*, *Helicosporum*, o *Aspergillus*, particularmente *T. borchii*, *T. albidum*, *V. dahliae*, *V. tenerum*, *N. crassa*, *Helicosporum sp* NH1 o *A. oryzae*.

El péptido puede tener actividad de fosfolipasa, por ejemplo actividad de fosfolipasa A, tal como actividad de fosfolipasa A1 y/o fosfolipasa A2.

Algunos ejemplos particulares son péptidos conocidos que tienen secuencias de aminoácido enumeradas en el listado de secuencias que sigue: los organismos de origen y las referencias en la literatura también están indicadas:

- SEC ID NO: 1: *Tuber borchii*. Soragni, E., et al. (2001) EMBO J. 20 : 5079-5090.
- SEC ID NO: 3 *Verticillium dahliae*. COGEME Phytopathogenic Fungi and Oomycete EST Database, Unisequence ID: VD0100C34.
- SEC ID NO: 4. *Neurospora crassa*. NCBI Protein database, gi: 18307435.
- SEC ID NO: 5. *Helicosporum sp*. NH1. NCBI Protein database, gi: 16519372.
- SEC ID NO: 7. *Aspergillus oryzae*. WO 0056762, SEC ID NO: 5954.
- SEC ID NO: 8. *Neurospora crassa*. TREMBL Protein database, EAA28927.

Además, las siguientes fosfolipasas fungales que tienen las secuencias indicadas, fueron aisladas por los inventores a partir de fuentes naturales adquiridas en colecciones públicas o recogidas en el país y año que se indican:

- SEC ID NO: 10. *Tuber albidum*. Adquirida en Centraalbureau voor Schimmel-cultures, Utrecht, Países Bajos, cepa CBS272,72.

- SEC ID NO: 12. *Verticillium tenerum*, Irlanda, 1996.

Los inventores insertaron el gen de *T. albidum* (SEC ID NO: 9) en *E. coli* y depositaron el clon bajo los términos del Tratado de Budapest el 12 de Febrero del 2003. El deposito se efectuó en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania, y se le adjudicó el número de deposito DSM 15441.

En una realización, la invención provee una fosfolipasa que es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que es por lo menos 80%, tal como por lo menos 85%, preferiblemente 90%, más preferiblemente por lo menos 95%, idéntica a los aminoácidos 91-210 en la SEC ID NO. 10 (*T. albidum*), aminoácidos 92-211 en la SEC ID NO. 1 (*T. borchii*), aminoácidos 30-137 en la SEC ID NO: 12 (*V. tenerum*), aminoácidos 38-145 en la SEC ID NO: 3 (*V. dahliae*), aminoácidos 44-151 en la SEC ID NO: 4 (*N. crassa*), aminoácidos 37-157 en la SEC ID NO: 7 (*A. oryzae*) o aminoácidos 58-168 en la SEC ID NO: 8 (*N. crassa*).

Procesamiento del péptido

Mediante el análisis de la secuencia de fosfolipasa en el listado de secuencias, los inventores hallaron que cada secuencia de aminoácido expresada consiste en un péptido señal, un péptido núcleo, y adicionalmente una secuencia peptídica de función desconocida unida al lado C- o N-terminal, o ambos, del péptido núcleo.

Péptido Núcleo

Los péptidos núcleo se caracterizan por la misma similaridad de secuencia del sitio activo y conservación del residuo cisteína observado por Soragni, E., et

al. (2001) EMBO J. 20: 5079-5090 para la fosfolipasa A2 del Grupo XIII fúngal/bacteriano.

En una realización preferida de la invención, los péptidos núcleo comprenden: a) la secuencia proporcionada por los aminoácidos 146-153 de la SEC ID NO: 1, aminoácidos 87-94 de la SEC ID NO. 3, o aminoácidos 79-86 de la SEC ID NO. 12; o una secuencia idéntica a cualquiera de estas secuencias de aminoácido excepto por la sustitución de un solo aminoácido con otro aminoácido; y b) dos residuos cisteína situados en el lado N-terminal de la secuencia proporcionada en a); y c) dos residuos cisteína situados en el lado C-terminal de la secuencia proporcionada en a).

Uno de los residuos cisteína situados en el lado N-terminal de la secuencia proporcionada en a), puede estar por ejemplo separado de la secuencia que se da en a) mediante 0-5 aminoácidos, tales como 0-3 aminoácidos, preferiblemente, 0-2 aminoácidos; y aún más preferiblemente un aminoácido. Otro de los residuos cisteína situados en el lado N-terminal de la secuencia proporcionada en a) puede estar por ejemplo separada de la secuencia que se da en a) por 14-20 aminoácidos, tal como 15-19 aminoácidos, preferiblemente, 16-18 aminoácidos, y aún más preferiblemente 17 aminoácidos.

Uno de los residuos cisteína situados en el lado C-terminal de la secuencia proporcionada en a), puede ser por ejemplo separada de la secuencia que se da en a) por 22-29 aminoácidos, tal como 23-28 aminoácidos, preferiblemente 24-27 aminoácidos y aún más preferiblemente 25-26 aminoácidos. Otro de los residuos cisteína situados en el lado C-terminal de la secuencia que se da en a) puede estar por ejemplo separada de la secuencia proporcionada en a) por 27-49 aminoácidos, tal como 29-46 aminoácidos, preferiblemente 30-43 aminoácidos, y aún más preferiblemente 32-42 aminoácidos, y más preferiblemente 35-40 aminoácidos.

En una realización preferida, el péptido núcleo comprende cuatro residuos cisteína alineados con los residuos cisteína de la SEC ID NO: 1 con los aminoácidos números 128, 144, 180 y 194, respectivamente cuando la secuencia de fosfolipasa expresada en forma completa está alineada simultáneamente con las secuencias proporcionadas en las SEC ID: 1, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 10 Y SEC ID NO: 12.

De acuerdo con la invención, el polipéptido expresado es disociado para separar el péptido núcleo de los péptidos unidos. La disociación puede efectuarse *in vivo* en las sales mediante la expresión de los mismos en un huésped fungal filamentoso apropiado o *in vitro*, por ejemplo mediante un tratamiento con una proteasa apropiada tal como por ejemplo Kex2.

Los puntos de disociación pueden hallarse dentro de 11 aminoácidos de una secuencia que es FG o dentro de 10 aminoácidos de una secuencia que es un sitio Kex2. Los sitios Kex 2 son por ejemplo RR, KR, KK o RK. En una realización el péptido núcleo tiene una longitud de 100-150 aminoácidos tal como de 110-140 aminoácidos, 115-133 aminoácidos, 118-129 aminoácidos, o 118-126 aminoácidos.

En una realización de la invención, la fosfolipasa expresada es disociada dentro de 0-18 aminoácidos, tal como 3-16 aminoácidos, preferiblemente 5-14 aminoácidos en el lado N-terminal de la secuencia que está alineada con los aminoácidos 97-101 de la SEC ID NO: 1, cuando la secuencia de fosfolipasa expresada en forma completa está simultáneamente alineada con las secuencias proporcionadas en las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 10, y SEC ID NO: 12.

En una realización preferida, la fosfolipasa expresada es disociada dentro de 0-11 aminoácidos, tal como 0-9 aminoácidos, preferiblemente 0-7 aminoácidos, en un lado terminal C de la secuencia que está alineada con los

aminoácidos 204-209 de la SEC ID NO: 1 cuando la secuencia de fosfolipasa expresada en forma completa está alineada simultáneamente con las secuencias proporcionadas en las SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 10, y SEC ID NO: 12.

En una realización preferida, la fosfolipasa procesada tiene una actividad de fosfolipasa específica, que es superior a la actividad del péptido expresado antes del procesamiento, por ejemplo, en una realización la actividad de fosfolipasa específica es por lo menos dos veces, más preferiblemente por lo menos cinco veces, más preferiblemente por lo menos diez veces la actividad de fosfolipasa específica del péptido expresado antes del procesamiento. En una realización de la invención el péptido expresado no tiene actividad de fosfolipasa mensurable antes del procesamiento.

La actividad de la fosfolipasa puede medirse por ejemplo en el ensayo LEU hidrolizando lecitina de soja (L-alfa-fosfatidilo-colina) a pH 8.0 y a 40°C durante dos minutos. La actividad de fosfolipasa se expresa como el régimen de consumo de la disolución (NaOH 0,1 M) necesaria para mantener el pH constante, en relación a un modelo.

Expresión en células huésped fungales filamentosas

La célula huésped fungal filamentosa puede ser por ejemplo una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Thermomyces*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, o *Trichoderma*, particularmente *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. nidulans*, *A. Niger*, *A. oryzae*, *F. bactridioides*, *F. cerealis*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. graminum*, *F. heterosporum*, *F. negundi*, *F. oxysporum*, *F. reticulatum*, *F. roseum*, *F. sambucinum*, *F. sarcochroum*, *F. sporotrichioides*, *F. sulphureum*, *F. torulosum*, *F. trichothecioides*, *F. venenatum*, *H. insolens*, *M. thermophila*, *N. crassa*, *P. purpurogenum*, *R. miehei*, *Thermomyces lanuginosus*,

Thielavia terrestres, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

En una realización preferida el organismo huésped es una cepa de *Aspergillus*, *Fusarium*, o *Trichoderma*, particularmente *A. oryzae*, *F. venenatum*, *F. sambucinum*, o *F. cerealis*.

La transformación, cultivo, expresión, recuperación pueden efectuarse por métodos convencionales, por ejemplo, los métodos generales descriptos en EP 238023, EP 305216, WO 9600787, EP 244234, o T. Christensen et al., BioTechnology, vol. 6, Dic. 1988, 1419-22.

Polipéptido de fosfolipasa y ADN

En una realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen actividad de fosfolipasa, y donde los polipéptidos comprenden, preferiblemente consisten en, una secuencia de aminoácido que tiene un grado de identidad con los aminoácidos 29 a 149 de la SEC ID NO: 16 (es decir, el polipéptido maduro) de por lo menos 80%, tal como por lo menos 85%, aún más preferiblemente por lo menos 90%, más preferiblemente por lo menos 95%, por ejemplo, por lo menos 96%, tal como por lo menos 97%, y aún más preferiblemente por lo menos 98%, tal como por lo menos 99%.

Preferiblemente, los polipéptidos comprenden la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 16; una variante alelica de la misma; o un fragmento de la misma que tiene actividad de fosfolipasa. En otra realización preferida, el polipéptido de la presente invención comprende los aminoácidos 29 a 149 de la SEC ID NO: 16. En otra realización preferida, el polipéptido consiste en los aminoácidos 29 a 149 de la SEC ID NO: 16.

La presente invención se refiere también a un polinucleótido que comprende, preferiblemente que consiste en una secuencia nucleotídica que tiene por lo menos una identidad del 80% con los nucleótidos 133 a 495 de la SEC ID

NO: 15. Preferiblemente la secuencia nucleotídica tiene por lo menos una identidad del 85%, tal como por lo menos una identidad del 90%, más preferiblemente por lo menos una identidad del 95%, tal como por lo menos una identidad del 96%, por ejemplo, por lo menos una identidad del 97% aún más preferiblemente por lo menos una identidad del 98%, tal como por lo menos 99%, con los nucleótidos 133 a 495 de la SEC ID NO: 15. Preferiblemente, la secuencia nucleotídica codifica un polipéptido que tiene actividad de fosfolipasa.

La fosfolipasa puede derivar de una cepa de *Fusarium*, particularmente, *F. venenatum*, usando sondas diseñadas en base a la secuencia de ADN en esta memoria. En una realización, la fosfolipasa tiene actividad de fosfolipasa A.

La fosfolipasa puede producirse transformando una célula huésped apropiada con una secuencia de ADN que codifica la fosfolipasa, cultivar el organismo transformado bajo condiciones que permiten la producción de la enzima, y recuperar la enzima del cultivo.

El organismo huésped es preferiblemente una célula eucariótica en particular una célula fungal tal como una célula de levadura, o una célula fungal filamentosa tal como una cepa de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* o *Saccharomyces*, particularmente *A. Niger*, *A. oryzae*, *F. venenatum*, *F. sambucinum*, *F. cereales* o *S. cerevisiae*, por ejemplo una cepa de *A. Niger* productora de glucoamilasa tal como las que se describen en la Patente Norteamericana Nº 3677902 o un mutante de la misma. La producción de la fosfolipasa en dichos organismos huésped puede efectuarse por los métodos generales descriptos en la EP 238.023 (Novo Nordisk), WO 96/00787 (Novo Nordisk) o Patente Europea EP 244.234 (Alko).

El vector de expresión de la invención incluye típicamente secuencia de control que funcionan como un promotor, una señal de iniciación de traducción, y opcionalmente, un marcador seleccionable, un terminador de transcripción, un

gen represor o varios genes activadores. El vector puede ser un vector de replicación autónoma o puede estar integrado en el genoma de la célula huésped.

Alineación e identidad de secuencia

Las secuencias nucleotídicas pueden alinearse con la aplicación de AlignX del Vector NTI Program Suite 7.0, usando los valores predeterminados (default settings) que emplean un algoritmo ClustalW modificado (Thompson, J.D., Higgins, D.G., y Gibson T.J. (1994) Nuc. Acid Res. 22: 4673-4680) la matriz de valoración swgapdnarnt, un "penalty" de abertura de brecha de 15 y un "penalty" de extensión de brecha de 6,66.

Las secuencias de amino ácido pueden alinearse con la aplicación AlignX el Vector NTI Program Suite v8 usando valores predeterminados (default settings) que emplean un algoritmo ClustalW modificado (Thompson, J.D. Higgins, D.G., y Gibson T.J., 1994), la matriz de valoración biosum62mt2, un "penalty" de abertura de brecha de 10 y un "penalty" de extensión de brecha de 0,1.

En una realización de la invención, las alineaciones de secuencias y el cálculo de valoración de homología, se efectúan usando el Método Lipman-Pearson (Lipman, D.J. y W.R. Pearson 1985) Búsquedas de similaridad de proteína rápidas y sensibles. Science 227: 1435-1441) usando una tabla de ponderación de residuos PAM250 (Dayhoff, M.O., R.M. Schwartz, B.C. Orcutt (1978). Un modelo de cambio evolutivo en proteínas. En Dayhoff, M.O. (ed), Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. Vol. 5, Supl. 3: pp. 345 - 358) y los valores predeterminados (default settings) del programa de MegAlign, v4.03, en el paquete de software Lasergene (DNASTAR Inc., 1228 South Park Street, Madison, Wisconsin 53715). Los valores predeterminados (default settings) son un K-túple de 2, "penalty de brecha de 4, y "penalty" de longitud de brecha de 12.

Hidrólisis de Fosfolípidos

La invención puede usarse en la hidrólisis de cualquier fosfolípido tal como una lecitina, una cefalina, o una inositida.

La invención puede usarse de manera análoga con procedimiento de la técnica anterior mediante el reemplazo de la fosfolipasa, por ejemplo, una producción de productos horneados WO 0032758, WO 9953769, mayonesa (GB 1525929, US 4034124), o para el tratamiento de aceites vegetales (US 5264367).

Uso de fosfolipasa

La fosfolipasa de la invención puede usarse en varias aplicaciones industriales de fosfolipasas, por ejemplo, tal como se describe a continuación.

Uso para hornear

La fosfolipasa de la invención puede usarse para la preparación de masa, pan y tortas, por ejemplo para mejorar la elasticidad del pan o torta. Por lo tanto, la fosfolipasa puede usarse en un procedimiento para preparar pan, que comprende agregar la fosfolipasa a los ingredientes de una masa, amasar dicha masa y hornear la masa para preparar el pan. Esto puede efectuarse de manera análoga a las patentes US 4567056 o WO 99/53769.

Uso para detergentes

La variante puede usarse como un aditivo para detergentes, por ejemplo en una concentración (expresada como proteína de enzima pura) de 0,001-10 (por ejemplo 0,01-1) mg por gramo de detergente o 0,001-100 (por ejemplo 0,01-10) mg por líquido del líquido que se usa para el lavado.

La composición del detergente de la invención puede formularse por ejemplo para una composición de detergente para lavar a mano o en lavarropas, que incluye una composición de un aditivo para lavar la ropa que es apropiado para el pre-tratamiento de telas teñidas y una composición suavizante para telas que se agrega al enjuague, o puede formularse en forma de una composición

detergente para ser usada en operaciones de limpieza para superficies duras en general que se encuentran en el hogar. En un detergente para el lavado de ropa la variante puede ser eficaz para la remoción de manchas de grasa, para el mantenimiento de la blancura y para limpiar manchas. Una composición detergente para el lavado de ropa puede formularse tal como se ha descripto en las Patentes GB 2247025, WO 9901531 o WO 9903962.

La composición detergente de la invención puede formularse particularmente para operaciones de lavado de vajilla en forma manual o en máquinas lavavajillas (por ejemplo tal como se describió en las Patentes GB 2.247.025 (Unilever) o WO 99/01531 (Procter & Gamble). En una composición para un lavavajillas, la variante puede ser eficaz para la remoción de manchas de grasa/aceite, para prevención de las manchas/decoloración de la vajilla y de los componentes plásticos del lavavajilla, causada por componentes de colores fuertes, y para evitar los depósitos de jabón residual en el lavavajilla.

Otros usos

La fosfolipasa de la invención puede usarse para mejorar la filtrabilidad de una solución o suspensión acuosa de origen carbohidratado mediante el tratamiento de la misma con la fosfolipasa. Esto es particularmente aplicable a una solución de una suspensión que contiene un hidrolizado de almidón, especialmente un hidrolizado de almidón de trigo, debido al hecho de que este tiende a ser difícil de filtrar y provee filtrados turbios. El tratamiento puede efectuarse de manera análoga a la Patente Europea EP 219.269 (CPC Internacional).

Además, la fosfolipasa de la invención puede usarse para la hidrólisis parcial de fosfolípidos, preferiblemente de lecitina, para obtener emulsionantes de fosfolípidos mejorados. Esta aplicación se describe además en la Enciclopedia

Ullmann de Química Industrial (Publicado por: VCH Weinheim (1996)), Patente Japonesa 2794574, y patente Japonesa JP-B 6-087751.

Además, la fosfolipasa de la invención puede usarse en un procedimiento para la producción para alimento para animales que comprende mezclar la fosfolipasa con sustancias alimenticias y por lo menos un fosfolípido. Esto puede efectuarse de manera análoga a la Patente Europea 743 017.

Además, la fosfolipasa de la invención puede usarse en un procedimiento para reducir el contenido de fosfolípido en un aceite comestible, que comprende tratar el aceite con la fosfolipasa para hidrolizar una parte principal del fosfolípido, y para separar una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado del aceite. Este procedimiento es aplicable a la purificación de cualquier aceite comestible que contiene fosfolípidos, por ejemplo, aceites vegetales como aceites de harina de soja, aceite de semilla de colza y aceite de girasol. La fosfolipasa puede usarse por ejemplo en los procedimientos descriptos en la Patente Japonesa A-2-153997 y Patente Norteamericana 5264367.

Método para la producción de queso

La fosfolipasa de la invención puede usarse para producir queso de manera análoga al procedimiento que se da en la Patente Norteamericana 6399121.

En una realización preferida de la invención, el queso se produce poniendo en contacto leche de queso o una fracción de leche de queso con una fosfolipasa de la invención, para producir queso a partir de la leche de queso.

En una realización preferida adicional se produce queso poniendo en contacto la leche de queso o una fracción de leche de queso con una fosfolipasa donde la fosfolipasa comprende:

- a) la secuencia proporcionada por los aminoácidos 146-153 de la SEC ID NO: 1, los aminoácidos 87-94 de la SEC ID NO: 3, los aminoácidos 79-86 de la SEC ID NO: 12; o una secuencia idéntica a cualquiera de estas secuencias de aminoácido excepto por la sustitución de un solo aminoácido con otro aminoácido; y
- b) dos residuos cisteína situados en el lado N-terminal de la secuencia proporcionada en a); y
- c) dos residuos cisteína situados en el lado C-terminal de la secuencia que se da en a).

En el presente contexto, el término leche de queso cubre cualquier composición a base de leche usada para la producción de queso. Una fracción de leche de queso puede ser cualquier fracción de esta leche de queso tal como por ejemplo crema, leche descremada, leche natural, leche de manteca, manteca o grasa de leche.

En una realización preferida, la leche de queso o una fracción de la leche de queso se pone en contacto con una fosfolipasa de la invención en una cantidad suficiente para disminuir el efecto oleoso del queso y/o para aumentar el rendimiento del queso. El efecto oleoso es la tendencia del queso a formar aceite libre por almacenamiento y/o por fusión.

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir queso que comprende tratar una composición láctea con una fosfolipasa de la invención y producir queso a partir de la composición láctea.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para producir queso que comprende tratar una composición láctea con fosfolipasa y producir queso a partir de la composición láctea, donde la fosfolipasa está seleccionada del grupo de fosfolipasa de PLA2 del Grupo XIII fungal/bacteriano. En una realización preferida de la invención, la PLA2 del Grupo XIII fangal/bacteriano es

de un hongo, más preferiblemente de un hongo que pertenece a los *Ascomycetes*.

Una fosfolipasa que pertenece a la PLA2 del Grupo XIII fungal/bacteriano puede ser cualquier fosfolipasa que pertenece a este grupo tal como ha definido Soragni et al., The EMBO Journal, 20 (2001), 5079-5090, y puede ser por ejemplo de las especies *Tuber*, por ejemplo *T. borchii*, *Streptomyces*, por ejemplo *S. coelicor*, *Verticillium*, por ejemplo, *V. dahliae*, *Aspergillus*, por ejemplo *A. oryzae*, *Neurospora*, por ejemplo *N. crassa*, o *Helicosporum*.

Una composición láctea de acuerdo con la invención puede ser cualquier composición que comprende constituyentes de la leche. Los constituyentes de la leche pueden ser cualquier constituyente de la leche tal como grasa de leche, proteína de leche, caseína, proteína del suero, y lactosa. Una fracción de leche puede ser cualquier fracción de leche tal como por ejemplo leche descremada, leche de manteca, suero, crema, leche en polvo, leche entera en polvo, leche descremada en polvo. En una realización preferida de la invención, la composición láctea comprende leche, leche descremada, leche de manteca, leche entera, suero, crema o cualquier combinación de las mismas. En una realización más preferida la composición láctea comprende leche tal como leche descremada, leche entera, crema, leche de manteca o cualquier combinación de la misma.

El tratamiento enzimático en el procedimiento de la invención puede llevarse a cabo dispersando la fosfolipasa en la composición láctea, y permitiendo que la reacción enzimática ocurra en un tiempo de la duración apropiada y a una temperatura apropiada. El tratamiento con fosfolipasa puede llevarse a cabo bajo condiciones elegidas para la adaptación a la enzima o enzima seleccionadas de acuerdo con principios bien conocidos en el arte.

El tratamiento enzimático puede llevarse a cabo a cualquier pH apropiado tal como por ejemplo en el rango de 2-10, tal como a un pH 4-9, o 5-7. En una realización el tratamiento con fosfolipasa se lleva a cabo a 3-60°C tal como a 25-45°C (por ejemplo durante por lo menos 5 minutos, tal como por ejemplo durante por lo menos 10 minutos, por lo menos 30 minutos, y por ejemplo durante 5-120 minutos). La fosfolipasa se agrega en una cantidad apropiada para producir el queso que tiene las propiedades deseadas. Preferiblemente la fosfolipasa se agrega en una cantidad que es eficaz para disminuir el efecto oleoso en el queso y/o para aumentar el rendimiento del queso. Una dosis de fosfolipasa apropiada está usualmente dentro del rango de 0,001-0,5 mg de proteína enzimática por g de grasa de leche, preferiblemente 0,01-0,3 mg de proteína enzimática por gramo de grasa de leche y más preferiblemente 0,02-0,1 mg de proteína enzimática por g de grasa de leche.

Los quesos producidos por el procedimiento de la presente invención comprenden todas las variedades de queso, tales como por ejemplo Campesino, Chester, Danbo, Drabant, Herregard, Manchego, Provolone, Saint Paulin, queso mantecoso, Suecia, Taleggio, queso blanco, incluyendo el queso cuajado, producido por la coagulación del cuajo de la cuajada de queso; quesos madurados tales como Chedar, Colby, Edad, Muenster, Gruyere, Emmenthal, Camembert, Parmesan, y Romano; queso azul, tal como queso azul Danés; quesos frescos tales como Feta; quesos ácidos coagulados tales como queso cremoso, Neufchatel, Quarg, queso Cottage, y Queso Blanco. En una realización preferida de la invención, dicha realización se prefiere a un procedimiento para producir queso de pasta hilada tal como por ejemplo Mozzarella y queso para pizza. La pasta hilada o cuajo estirado, son quesos que se distinguen normalmente por un único tratamiento plastificante y de amasado del cuajo fresco en agua caliente, lo cual imparte al queso terminado su característica de

estructura fibrosa, y propiedades de fusión y estiramiento, tal como por ejemplo la mozzarella y queso para pizza de "Mozzarella and Pizza chesse" de Paul S. Kindstedt, Queso: Química, física, y microbiología, Volumen 2: Grupos Principales de Queso, segunda edición, página 337-341, Chapman & Hall.

Listado de Secuencia y Microorganismos Depositados

La presente solicitud contiene información en forma de un listado de secuencias que está anexado a la solicitud e incluye también una nota de datos que acompaña esta solicitud. Además, la presente solicitud se refiere a los microorganismos depositados. El contenido de la nota de datos y de los microorganismos depositados se incorpora aquí en su forma completa como referencia.

Depósito de Material Biológico

El siguiente material biológico ha sido depositado bajo los términos del Tratado de Budapest con Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH, Mascheroder Weg 1 B, D-38124 Braunschweig, Alemania, y se le adjudicó el siguiente número de expediente:

Depósito	Número de Acceso	Datos de Depósito
<i>E. coli</i>	DSM 15441	12 de Febrero 2003
<i>E. coli</i>	DSM 15442	12 de Febrero 2003

MATERIALES Y METODOS

Medios y sustratos

Medio YP+2%G

10 g de extracto de levadura

20 g de peptona

agua hasta completar 1L

autoclave a 121°C, 20 minutos

agregado de 100 ml de solución de glucosa estéril al 20%.

Medio de esporulación RA

50 g de ácido succínico

12,1 g de nitrato de sodio

1 g de glucosa

20 ml de 50x sales de Vogel (Davis, R.H. y F.J. de Serres (1970), Meth. Enzymol. 17A:79-143)

los componentes se mezclan en un litro de agua destilada y se filtran en forma estéril.

Buffer Britton Robinson

0,023 M de ácido fosfórico

0,023 M de ácido acético

0,023 M de ácido bórico

Valoración con NaOH o con HCl hasta el pH deseado

Métodos

Actividad de Fosfolipasa (LEU)

La lecitina se hidroliza bajo pH y temperatura constante, y la actividad de fosfolipasa se determina como régimen de valoración (NaOH 0,1N) de consumo durante la neutralización del ácido graso liberado.

El sustrato es lecitina de soja (L- α -Fosfatidil-Colina) y las condiciones son pH 8,00, 40°C, tiempo de reacción 2 minutos. La unidad se define en relación a un modelo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Expresión de una fosfolipasa A2 de *Tuber albidum* en *Aspergillus oryzae*

La secuencia de ADN descrita en Soragni et al. (*supra*) se usó para diseñar cebadores para la amplificación por PCR de TbSP1 de ADN genómico con los sitios de restricción apropiados agregados a los extremos cebadores para facilitar

la clonación del producto por PCR (SEC ID NO: 13 Y 14). Se obtuvo una cepa de *Tuber albidum*, la CBS 272,72, (Países Bajos), y se cultivó sobre X-agar a 20°C, de acuerdo con las recomendaciones del CBS en la Lista de Cultivos, 1996. Se extrajo el micelio de la superficie de la placa, y se aisló el ADN total usando un equipo FastADN Spin Kit (BIO101, Inc., Vista, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación por PCR se llevó a cabo usando Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix (ABgene, Surrey, U.K.) siguiendo las instrucciones de los fabricantes y usando una temperatura de hibridación de 52°C durante los primeros 5 ciclos y de 62°C durante los últimos 25 ciclos. Se obtuvo un solo producto por PCR, y la secuencia se determinó y se presenta como la SEC ID N: 9 excluyendo los sitios de restricción sintéticos agregados. La comparación de esta secuencia genómica con la secuencia de ADNc presentada por E. Soragni et al. reveló un solo intrón. Cuando se extrajo el intrón, la secuencia nucleotídica de *T. albidum* CBS272,72 es 92,5% idéntica a la de *T. borchii* ATCC 96540, que es la cepa usada por E. Soragni et al. El correspondiente péptido pronosticado por la secuencia génica CBS272,72 de *T. albidum* es 93,8% idéntica a la secuencia peptídica mencionada por Soragni et al.

El fragmento de PCR fue restringido con *Bam*H1 y *Xba*I y clonado en el vector de expresión pMStr57 de *Aspergillus* usando técnicas convencionales. El vector de expresión pMStr57 contiene los mismos elementos que pCaHj483 (WO 98/00529), con modificaciones menores efectuadas en el promotor *Aspergillus* NA2, y tiene secuencias para la selección y propagación en *E. coli*, y para la selección y expresión en *Aspergillus*. Específicamente, la selección en *Aspergillus* es facilitada por el gen *Aspergillus* que permite el uso de acetamida como única fuente de nitrógeno. La expresión en *Aspergillus* es intermediada por un promotor de amilasa neutra modificada II (NA2) de *Aspergillus Níger* que está fusionada con la secuencia 5' líder de gen que codifica la triosa fosfato isomerasa (tpi) de

Aspergillus nidulans, y el terminador del gen que codifica la amiloglucosilasa de *Aspergillus niger*. El gen que codifica la fosfolipasa A2, la construcción de la expresión de *Aspergillus* resultante fue secuenciado y la secuencia se comparó con la previamente determinada para el fragmento de PCR no clonado, SEC ID NO: 9. Se encontró una sola mutación de T a C a 52 pares de bases cadena abajo del codón de interrupción.

El *Aspergillus oryzae* se transformó con pMStr70 usando técnicas convencionales descriptas por Christensen, T. et al., (1998), Biotechnology 6, 1419-1422. Los transformantes se cultivaron en un medio YP+2%G agitado a 275 RPM a 30°C, y la expresión de la fosfolipasa A2 de Tuber, TbPLA2, se monitoreó mediante SDS-PAGE.

Caracterización de la proteína

La SDS-PAGE reveló dos bandas, de un peso molecular aproximado de 25 y 16 kDa. El sobrenadante se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico sobre una columna de SP-sefarosa equilibrada con 50 nM de buffer de acetato y eluida con NaCl 1M a pH5,0. Las dos proteínas fueron eluidas en dos fracciones separadas. La concentración de proteína se determinó usando el Ensayo de Proteína ESL de Roche. La actividad se determinó en el ensayo LEU.

	P.M kDa	Concentración mg/ml	Actividad LEU/ml	Actividad específica LEU/mg
Pool 1	23-25	1,32	61	46
Pool 2	16	0,42	272	648

Las proteínas se sometieron a un secuenciamiento N-terminal. La secuencia N-terminal del Grupo 1 (banda de 23-25 kDa) correspondía a los aminoácidos 32-50 de la SEC ID NO: 10. El borrón del grupo 2 (banda de 16 kDa) reveló dos bandas con secuencias N-terminales que correspondían a los

aminoácidos 86-98 y 91-103, respectivamente. Los análisis del espectro de masa de las dos bandas mostraron masas de 13934 y 14348 Da respectivamente, apareándose dentro de 5 Da de valores calculados a partir de las secuencias de aminoácidos 86-210 y 91-210 de la SEC ID NO: 10, respectivamente.

Ejemplo 2: Procedimiento de purificación para dos formas de PLA2 de *T. albidum* expresadas en *Aspergillus oryzae*.

En la mayoría de las fermentaciones del transformante *aspergillus oryzae* descripto en el Ejemplo 1 que produce la PLA2 de *T. albidum*, se detectaron dos formas de la enzima durante la purificación. Una forma estaba en los 22-23 kDa en SDS-PAGE y correspondía al péptido informado por Soragni et al (*supra*). Adicionalmente, se detectó una nueva forma que abarcaba 16-17 kDa en SDS-PAGE y que tenía una actividad específica elevada y un alto punto isoeléctrico.

Purificación del péptido 22-23 kDa.

El sobrenadante de fermentación que contenía la fosfolipasa de *T. albidum* expresada en *A. oryzae* (preparada en el Ejemplo 1), se filtró con esterilización usando el filtro EKS adquirido en Seitz Schenk Bad Kreuznach, Bettringerstrasse 42, Alemania D-73550, Waldstetten.

El sobrenadante filtrado estéril fue ajustado a pH 8 y a una fuerza iónica bajo 4 mSi.

Cromatografía de Intercambio Aniónico

La primera etapa de purificación se llevó a cabo en una cromatografía de intercambio aniónico usando una columna de sefarosa de 50 ml Fast flor Q™ adquirida en Amersham Pharmacia. La columna se pre-equilibró con 50 mM de buffer de Tris acetato a pH 8. Luego se aplicó el caldo de fermentación filtrado en forma esterilizada sobre la columna, y luego la columna se lavó con el mismo buffer hasta que se eliminó todo el material no adherido.

Las proteínas fueron eluidas con el mismo buffer que contenía 1M de cloruro de sodio a pH 8 con un régimen de flujo de 5 ml/minuto y hasta un volumen final de 500 ml de buffer total. Se recogieron cada una de las fracciones de 5 ml usando un recolector de fracciones, y la actividad de fosfolipasa del contenido de todas las fracciones se ensayó cualitativamente usando lecitina como sustrato usando la L- α -Fosfatidil colina adquirida como producto Sigma P-5638, y la actividad se ensayó usando el equipo NEFA adquirido en Wako Chemicals GMBH, Nissan Strasse 2, 41468 Neuss, Alemania. El ensayo exacto se define a continuación.

Se prepararon soluciones de sustrato que contenían 10 mg/ml de sustrato de lecitina en diferentes buffers tales como 50 mM de acetato a pH 5 o 50 mM de Hepes a pH 7 o tris acetato a pH 9 como buffers que contenían Hepes pH 7 o 50 mM de 2 mM CaCl₂ y 0,1% de Triton X-100 adquirido en químicos Fluka. Luego se emulsionó el sustrato mediante agitación y calentamiento a 40°C y luego se enfrió a 40°C y se usó como sustrato.

El ensayo de la actividad se llevó a cabo usando 300 μ l de una emulsión de sustrato incubado con 25 μ l de las fracciones enzimáticas durante 20 minutos a 40°C y luego 30 μ l de la mezcla de ensayo fue transferida a 300 μ l del reactivo A de color NEFA C preparado de la manera descripta por el fabricante y se obtuvo durante 10 minutos a 37°C y se agregaron 600 μ l del reactivo de color de la solución de NEFA C B a dicha mezcla, y se incubaron adicionalmente durante 10 minutos. Luego se midió el color azul formado en un espectofotómetro a 505 nm.

Caracterización de la proteína

Luego se reunieron las fracciones que contenían actividad y se caracterizaron para el peso molecular usando electrofóresis de SDS-PAGE empleando geles pre fraguados Novex de 4 a 20% de geles de Tris-Glicina adquiridos en Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA 92008, USA.

Se detectó una proteína de 22-23 kDa y se formó el borrón y el análisis C-terminal se llevó a cabo usando un secuenciador de Applied Biosystem.

Se determinaron los primeros 19 residuos de aminoácido del lado N-terminal y se halló que tenían las secuencias de los aminoácidos 32-50 de la SEC ID NO: 10.

Purificación del péptido de 16-17 kDa

El sobrenadante de fermentación filtrado en forma estéril de la fosfolipasa de *T. albidum* expresada en *A. oryzae* se ajustó a pH 4,7 y se ajustó a la resistencia iónica por debajo de 4 mSi.

Cromatografía de intercambio catiónico

El flujo de SP-sefarosa™ fue adquirido en Amersham Pharmacia. Se cargaron 50 ml en la Columna y se equilibró con 50 mM de buffer de acetato a pH 4,7, luego se aplicó el sobrenadante de fermentación a la columna y se lavó el material no adherido usando el mismo buffer.

La proteína adherida con elevado pl fue luego eluida con un gradiente de sal lineal usando 50 mM de buffer de acetato a pH 4,7 que contenía cloruro de sodio 1 M. Las fracciones y el régimen de flujo fueron similares a los que se usaron para la forma de bajo pl de la fosfolipasa. La actividad de fosfolipasa en las fracciones se ensayó cualitativamente usando el equipo NEFA tal como anteriormente. Las fracciones que contenían la actividad de fosfolipasa se reunieron, y la SDS-PAGE se llevó a cabo tal como se describió anteriormente.

Se observó una proteína de 16-17 kDa que tenía un alto punto isoeléctrico por arriba de 9.

El análisis N-terminal de la proteína se llevó a cabo después de formar el borrón con la proteína y usando el secuenciador de Applied biosystem que mostró un lado N-terminal que era completamente diferente del publicado en Soragni et al (supra). Por lo tanto se halló que la PLA2 de *T. albidum* tenía dos formas que

derivaban de diferentes procesos N-terminales con secuencias N-terminales que correspondían a los aminoácidos 86-105 y 91-110 de la SEC ID NO: 10, respectivamente.

Ejemplo 3: queso preparado con fosfolipasa de *T. albidum*

Se usó crema pasteurizada, no homogeneizada (North Carolina State University Dairy Plant) para estandarizar 500 gramos de leche descremada pasteurizada no homogeneizada (North Carolina State University Dairy Plant) a 3,5% de grasa produciendo de este modo un queso de mozzarella de grasa entera. La leche para la elaboración del queso para cada experimento se trató con 16-17 kD de fosfolipasa de *T. albidum* preparada de acuerdo con el Ejemplo 2, o bien con la fosfolipasa comercial Lecitase 10 L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), y se colocó en un baño de agua a 35°C hasta que se equilibró a esa temperatura. Se tomó el pH inicial de la leche para la elaboración del queso, y se agregaron 0,01% (p/p) de cultivo inicial.

El pH se monitoreó hasta alcanzar un pH de 6,4. Se diluyeron 250 µl de cuajo (Novozym 89L) hasta una solución de 9 ml en total con agua desionizada, y 1 ml de esta solución se agregó a la leche de queso, y la leche de queso se agitó vigorosamente durante 3 minutos. Se sacó la barra agitadora y la leche cuajada se dejó reposar a 35°C.

Después de los tratamientos precedentes, el cuajo estuvo listo para ser cortado con una espátula que se insertó y cuyos bordes afilados pudieron observarse. El queso se cortó empujando el elemento cortador hacia abajo mientras se mantenía el frasco dando vuelta rápidamente el elemento cortante y finalmente sacándolo hacia arriba. El cuajo se dejó en reposo durante 5 minutos y luego se agitó suavemente con una cuchara. La temperatura se elevó a 41°C con una suave agitación intermitente durante aproximadamente 45 minutos o hasta que el pH bajó hasta 6,0-5,9. El cuajo se escurrió usando una estopilla y luego se

reemplazó en el frasco y se mantuvo a 41°C en un baño de agua mientras se vertía suero siempre que era necesario.

Cuando el cuajo alcanzó un pH de 5,3, el bol de acero inoxidable con el cuajo adentro se inundó con un baño de agua a 69°C durante 5 minutos y luego se estiró en forma manual. El cuajo se templó enfriándolo en agua helada durante 30 minutos. El cuajo de queso se secó con una toallita de papel, se pesó y se refrigeró durante la noche.

Se llevaron a cabo experimentos de control para la elaboración de queso a partir de la misma tanda de leche siguiendo los mismos procedimientos, excepto que no se le agregó fosfolipasa.

Se calculó el rendimiento real del queso como peso de queso después del estiramiento en relación al peso total de la leche de queso.

El rendimiento del queso ajustado por humedad se expresó como el rendimiento real ajustado a un nivel de humedad constante convencional. Se calculó el rendimiento ajustado por humedad multiplicando el rendimiento real y la relación del contenido de humedad real a humedad standard, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$Y_{adj} = (Y_{act} \times 1 - M_{act}) / (1 - M_{std})$$

donde Y_{adj} = rendimiento del queso ajustado por humedad, Y_{act} = rendimiento real del queso, M_{act} = fracción de humedad real & M_{std} = fracción de humedad Standard (0,48).

El rendimiento del queso ajustado por humedad de todos los experimentos y controles se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Tratamiento	Fosfolipasa mg de proteína enzimática/g de grasa	Rendimiento del queso ajustado por humedad	Aumento del rendimiento en comparación con el control
Control	0	10,72	2,9%
<i>T. albidum</i> PLA2	0,055	11,04	
Control	0	11,25	2,8%
<i>T. albidum</i> PLA2	0,055	11,57	
Control	0	9,22	2,7%
Lecitase® 10L	0,18	9,48	
Control	0	9,62	2,8
Lecitase® 10L	0,18	9,90	

Ejemplo 4: Clonación y expresión de una fosfolipasa (FvPLA2) de *Fusarium venenatum* en *Aspergillus oryzae*

Células de *Fusarium venenatum* A3/5 (originalmente depositadas como *Fusarium graminearum* ATCC 20334 y recientemente reclasificadas como *Fusarium venenatum* por Yoder y Christianson, 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 62-80; y O'Donnell et al., 1998, Fungal Genetics and Biology 23: 57-67) se cultivaron durante dos días en un medio mínimo de Vogel (Davis, R. H. y F. J. de Serres (1970), Meth. Enzymol. 17A79-143) a 28°C en cultivos mantenidos bajo agitación, filtrados en una tela Miracloth esterilizada (Calbiochem, San Diego, California, USA), y se transfiere a un "medio de esporulación" en el cual se incuban en un cultivo bajo agitación durante 24 horas adicionales a 28°C. Se recogieron células y esporas por centrifugación y se lisaron y se extrajo el ARN y se transcribió en ADNc el cual fue clonado en pZErO-2 mediante los métodos

descritos en WO 00/56762. La cantidad de clones independientes en esta colección antes de la amplificación fue de $2,5 \times 10^5$, de los cuales 92% contenían insertos de un tamaño comprendido entre 550-2500 pb. Se determinaron las secuencias del ADN parcial para aproximadamente 1000 clones elegidos al azar, y se almacenaron las secuencias en una base de datos de computadora mediante los métodos descriptos en WO 00/56762.

La secuencia nucleotídica de un ADNc que codifica TbSP1, que es una fosfolipasa A2 de *Tuber borchii*, y la correspondiente traducción del péptido fueron descriptos por E. Soragni et al., 2001. Esta secuencia de péptido traducida se compara con las traducciones de las secuencias de ADNc parcial de *Fusarium venenatum* usando el programa TFASTXY, versión 3,3t08 (Pearson et al., 1997). Una secuencia de *F. venenatum* traducida se identificó como poseedora de una identidad del 42% para TbSP1 a través de una superposición de 125 aminoácidos. La secuencia completa del inserto de ADNc del clon correspondiente, FM00700, se determinó y está presente como SEC ID NO: 15, y el péptido traducida para esta secuencia FvPLA2, se presenta como SEC ID NO: 16. Esta secuencia se usó para diseñar los cebadores PvPLA1 y FvPLA2,2 para la amplificación por PCR del gen que codifica FvPLA2 de FM0700, con agregado de sitios de restricción apropiados a los extremos cebadores para facilitar la subclonación del producto de PCR.

FvPLA1: CTGGGATCCTCAAGATGAAGTTCAGCG

FvPLA2.2: GACCTCGAGACCCGCCATTAAAGATT

Se efectuó la amplificación por PCR usando Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix (AB-gene, Surrey, U.K.), siguiendo las instrucciones de los fabricantes y usando una temperatura de acoplamiento de 52°C y una temperatura de extensión de 60°C para 20 ciclos.

El fragmento de PCR fue restringido con BamHI y Xhol y se clonó en el vector de expresión pMStr57 de *Aspergillus* usando técnicas convencionales. El vector de expresión pMStr57 contiene los mismos elementos que el pCaHj483 (WO 98/00529), con modificaciones menores efectuadas para el promotor *Aspergillus* NA2 como ha sido descripto para el vector pMT2188 en WO 01/12794, y tiene secuencias para la selección y propagación en *E. coli*, y para la selección y expresión en *Aspergillus*. Específicamente, la selección en *Aspergillus* es facilitada por el gen amdS de *Aspergillus nidulans*, el cual permite el uso como acetamida como única fuente de nitrógeno. La expresión en *Aspergillus* es intermediada por un promotor de amilasa II neutra (NA2) modificada de *Aspergillus Niger* la cual está fusionada con la secuencia líder 5' del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa (tpi) de *Aspergillus nidulans*, y el terminador del gen que codifica la amiloglucosilasa de *Aspergillus Niger*. El gen que codifica la fosfolipasa de la construcción de expresión de *Aspergillus* resultante, pMStr77, fue secuenciado, y la secuencia estaba completamente de acuerdo con la que se determinó previamente para el inserto de FM0700.

La cepa *Aspergillus oryzae* BECh2 (WO 00/39322) fue transformada con pMStr77 usando técnicas convencionales (T. Christensen et al., 1988). Los transformantes se cultivaron en un medio YP+2%G agitado a 275 RPM a 30°C y la expresión de FvPLA2 se monitoreó mediante SDS-PAGE.

Una cepa de *Escherichia coli* que contiene un gen que codifica la fosfolipasa de *F. venenatum* fue depositado por los inventores bajo los términos del Tratado de Budapest en Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GMBH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania. La fecha de depósito fue el 12 de febrero del 2003, y el número de acceso fue DSM 15442.

Ejemplo 5: Purificación y comparación de secuencia de FvPLA2

El FvPLA2 de la fermentación del ejemplo 4 se purificó por cromatografía de intercambio iónico en una columna de SP-sefarosa equilibrada con 50 mM de buffer de acetato, pH 4,7, y se eluyó con NaCl 1M a pH 4,7. Se analizaron las fracciones sobre SDS-PAGE, y se reunieron las fracciones que contenían la proteína de 14 kDa. La identidad de la proteína pura se confirmó determinando la secuencia N-terminal, la cual era idéntica a la secuencia del aminoácido (aa) 29-40 de SEC ID NO: 16. Adicionalmente, la masa del péptido se determinó por análisis de espectro de masa, debido al hecho de que el tamaño aparente estimado a partir de SDS-PAGE, 14 kDa, es menor que el que fue pronosticado para el péptido mediante el procesamiento del péptido teórico en la SEC ID NO: 16. La masa del FvPLA2 activo, purificado, fue de 13336 Da. Esta masa molecular indica un procesamiento adicional en el término C, y coincide con una disociación entre los aminoácidos 149 y 150 en la SEC ID NO: 16, debido a que la secuencia del péptido de aminoácido 29 a 149 tiene una masa teórica de 13335,66 Da.

Una comparación del péptido maduro procesado (aminoácidos 29-149 de la SEC ID NO: 16) con secuencias conocidas mostró que la secuencias de la técnica anterior más próxima era una fosfolipasa de *Verticillium dahliae* traducida a partir de Unisequence ID: VD0100C34 COGEME Phytopathogenic Fungi y Oomycete EST Database Versión 1,2 (<http://cogeme.ex.ac.uk/>) (Soanes et al. (2002) Genómica de hongos fitopatógenicos y desarrollo de recursos bioinformáticos. Mol Plant Microbe Interact. 15(5):421-7). El procesamiento del péptido parcial pronosticado a partir de la secuencia *V. dahliae* se estimó por comparación con el proceso hallado para FvPLA2. La identidad entre los aminoácidos 29 a 149 de SEC ID NO: 16 , y la secuencia estimada del péptido maduro de la fosfolipasa de *V. dahliae* se calculó que era del 77%.

Ejemplo 6: propiedades físicas de FvPLA2

Actividad catalítica

La actividad de la fosfolipasa como función de la concentración enzimática, se determinó en el ensayo LEU para FvPLA2 del ejemplo 4. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Concentración de enzima ($\mu\text{g/ml}$)	LEU ($\mu\text{eq NaOH/min}$)
71,1	14,0
53,3	12,7
21,3	10,6
10,7	7,4
5,3	5,6
2,7	4,1

Perfil de la temperatura

La actividad enzimática como función de la temperatura se determinó para una solución enzimática con una concentración de 5,3 $\mu\text{g/ml}$. Otras condiciones son tal como el ensayo LEU. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Temperatura 8°C)	LEU ($\mu\text{eq NaOH/min}$)
25	3,10
35	4,87
40	5,41
45	6,97
50	7,86
55	9,03
60	8,27
65	6,90

Estabilidad de pH

La enzima se diluyó en un buffer de Britton Robinson bajo el pH especificado durante 30 minutos a 30°C. Después de dilución adicional se midió la actividad catalítica en agua en el ensayo LEU. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

pH	LEU (μ eq NaOH/min)
2	3,78
3	5,11
4	5,60
5	5,49
6	5,37
7	5,61
8	5,52
9	5,64
10	5,50
11	5,21

Termoestabilidad

La enzima se diluyó en buffer de Britton Robinson a pH 3 y 10 respectivamente, y a pH 7 con 30% de sorbitol. Después de la incubación a la temperatura especificada durante 30 minutos, la solución se enfrió a la temperatura de reacción y se ensayó en el ensayo LEU. Los resultados se muestran en la Tabla 4; las actividades se dan con relación a la actividad más alta medida.

Tabla 4: actividad relativa (%) como función del pH y la temperatura

Temperatura (°C)	pH 3	pH 10	pH 7/30% de sorbitol
30	100%	100%	87%
40	95%	92%	100%
50	16%	14%	68%
60	1%	0%	2%

Ejemplo 7: Elaboración de queso con FvPLA2

Se usó crema pasteurizada, no homogeneizada (North Carolina State University Dairy Plant) para estandarizar 500 gramos de leche descremada pasteurizada, no homogeneizada (North Carolina State University Dairy Plant) con 3,5% de grasa produciendo de esta manera un queso mozzarella con la totalidad de la grasa.

La leche de queso de cada experimento se trató con *F. venenatum* fosfolipasa (FvPLA2) preparada de acuerdo con ejemplo 5, o bien con la fosfolipasa comercial Lecitase® 10L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), y se colocó en un baño acuoso a 35°C hasta equilibrarla a esta temperatura. El pH inicial de la leche para el queso se tornó y se agregaron 0,01% (p/p) de cultivo de partida.

Se monitoreó el pH hasta alcanzar un pH de 6,4. Se diluyeron 250 µl de cuajo (Novozym 89L) hasta una solución total de 9 ml con agua desionizada, se agregó 1 ml de esta solución a la leche de queso y la leche de queso se agitó vigorosamente durante 3 minutos. Se sacó la barra agitadora, y la leche cuajada se dejó en reposo a 35°C.

Después de los tratamientos precedentes, el cuajo estaba listo para ser cortado cuando se insertaba una espátula y se podían observar los bordes

afilados. El queso se cortó empujando la cuchilla hacia abajo mientras se sostenía el recipiente y se daba vuelta rápidamente la cuchilla y finalmente se la sacaba hacia arriba. El cuajo se dejó en reposo durante 5 minutos y luego se agitó suavemente con una cuchara. La temperatura se elevó hasta 41°C con una suave agitación intermitente durante aproximadamente 45 minutos o hasta que el pH bajo hasta 6,0 – 5,9. Se escurrió el cuajo usando una estopilla y luego se depositó en el recipiente y se mantuvo a 41°C en un baño de agua mientras se escurría el suero si era necesario.

Cuando el cuajo alcanzó un pH de 5,3, el bol de acero inoxidable con el cuajo adentro se inundó con un baño de agua a 69°C durante 5 minutos y luego se estiró en forma manual. El cuajo se templó enfriándolo en agua helada durante 30 minutos. El cuajo de queso se secó con una toallita de papel, se pesó y se refrigeró durante la noche.

Se llevaron a cabo experimentos de control para la elaboración de queso a partir de la misma tanda de leche siguiendo los mismos procedimientos, excepto que no se le agregó fosfolipasa.

Se calculó el rendimiento real del queso como peso de queso después del estiramiento en relación al peso total de la leche de queso.

El rendimiento del queso ajustado por humedad se expresó como el rendimiento real ajustado a un nivel de humedad constante convencional. Se calculó el rendimiento ajustado por humedad multiplicando el rendimiento real y la relación del contenido de humedad real a humedad standard, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$Y_{adj} = (Y_{act} \times (1 - M_{act})) / (1 - M_{std})$$

donde Y_{adj} = rendimiento del queso ajustado por humedad, Y_{act} = rendimiento real del queso, M_{act} = fracción de humedad real & M_{std} = fracción de humedad Standard (0,48).

El rendimiento del queso ajustado por humedad de todos los experimentos y controles se muestra en la Tabla 1.

Tabla 5

Tratamiento	Fosfolipasa mg de proteína enzimática/g de grasa	Rendimiento del queso ajustado por humedad	Aumento del rendimiento en comparación con el control
Control	0	11,70	
FvPLA2	0,071	11,95	2,1%
Control	0	11,50	2,8%
FvPLA2	0,071	11,83	
Control	0	9,22	
Lecitase® 10L	0,18	9,48	2,7%
Control	0	9,62	
Lecitase® 10L	0,18	9,90	2,8

Ejemplo 8: Elaboración de queso con FvPLA2

Se pasterizó la leche a 72°C durante 15 segundos y luego se enfrió por debajo de los 10°C. La leche se estandarizó a 2,4% de grasa con crema. Después de la estandarización, la leche se pre-calentó en un intercambiador de calor a una temperatura de pre-maduración de 34,5°C. Se vertieron 150 kg de leche en cada cuba para el queso y se agregaron 15 g de cultivo (F-DVS ST-M6). La fosfolipasa del ejemplo 5 se agregó en una dosis de 5 LEU/g y la leche se incubó durante 1 hora a 34,5°C. Se agregó cuajo (Chy-Max Plus, 200 IMCU) y se continuó la agitación durante no más de 4 minutos.

Después de aproximadamente 60 minutos, cuando se juzgó que el coágulo estaba listo, se cortó usando cuchillas de 10 milímetros. Se puso nuevamente el agitador en la cuba y después de 10 minutos se inició la operación de escaldado mediante el aumento de la temperatura hasta 41°C dentro de 30 minutos. Después de alcanzar los 41°C se llevó a cabo una agitación adicional durante aproximadamente 20 minutos hasta que se alcanza una acidez de una valoración de 0,15-0,16%. Se deja sedimentar el cuajo en la cuba, y se escurre el suero. El cuajo se corta en bloques uniformes y los bloques se dan vuelta y se apilan en dos pilas. Subsiguentemente, a intervalos de 10 minutos, se dan vuelta los bloques y se mantienen en pilas de dos. A un pH de alrededor de 5,15-5,20, se tritura el cuajo en una máquina trituradora. Los trozos de cuajo se agregan con 2% de sal (peso/peso). Después de la trituración se agrega todo el cuajo en el lugar donde será estirado, que contiene 70l de agua precalentada a 74°C. Se transfieren alrededor de 20 l de agua caliente a la cámara superior y se agrega el queso. Cuando la temperatura del cuajo alcanza los 62°C, se detiene el estiramiento y se pasa el cuajo al extrusor. Los quesos se extruyeron en 8-9 piezas se queso, cada una de 2,3 kg, y se enfriaron en agua a 5-7 °C durante 20 minutos. Después de 20 minutos, los quesos enfriados se pasaron a salmuera saturada, y se mantuvieron en salmuera durante 1,5 horas a 5-6°C. La salmuera se preparó mezclando 120 kilos de agua, agregando sal a 22Be, 750 g CaCl₂ (solución al 34%) y ajustando a pH 5,1. Después de pasarlo por salmuera se secó cada uno de los quesos durante aproximadamente 30 minutos, y se pesó antes de envasarlos al vacío. Se tomaron muestras para el pH y para los análisis de la composición (humedad, sal, grasa y proteína) después de aproximadamente 1 semana de almacenamiento en un ambiente frío.

El rendimiento real (AY) se ajustó a un contenido de humedad del 48% en el queso.

Rendimiento Ajustado = AY x (100 - % de humedad)

100 - 48

Tabla 6

	Rendimiento ajustado (kg) Control	Rendimiento ajustado (kg) Experimental	Aumento del rendimiento promedio (kg)	Aumento del rendimiento (%)
Día 1	10,62	10,81		
	10,70	10,90	0,195	1,8
Día 2	9,90	10,16		
	9,95	10,14	0,225	2,3
Día 3	10,00	10,15		
	10,01	10,16	0,15	1,5

Ejemplo 9: Sobreexpresión de *Aspergillus oryzae* PLA2 (AoPLA2) en *Aspergillus oryzae*.

Medio:

DAP2C-1

11g MgSO₄.7H₂O

1 g KH₂PO₄

2 g de monohidrato de ácido cítrico.

30 g de maltodextrina

6 g de K₃PO₄.3H₂O

0,5 g de extracto de levadura

0,5 ml de una solución de metales vestigiales

1 ml de Pluronic PE 6100 (BASF, Ludwigshafen, Alemania)

Se mezclaron los componentes en un litro de agua destilada y se dividieron en porciones en frascos, agregando 250 mg de CaCO₃ a cada porción de 150 ml.

El medio se esterilizó en un autoclave. Después de enfriar se agregó lo que sigue a 1 litro de medio:

23 ml de 50% p/v $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, esterilizado por filtro

33 ml de ácido láctico al 20%, esterilizado por filtro.

Solución de metales vestigiales

6,8 g ZnCl_2

2,5 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

13,9 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

8,45 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

3 g de monohidrato de ácido cítrico

Los componentes se mezclaron en un litro de agua destilada.

La clonación y el secuenciamiento parcial de un ADNc que codifica una fosfolipasa A₂ de *Aspergillus oryzae* se describe en la WO 00/56762. La secuencia completa del clon AS3812 se provee en la SEC ID NO: 6.

Esta secuencia se usó para diseñar el cebador AoPLA1 que se usa con el cebador vector pYESrev en amplificación por PCR del gen que codifica el PLA2 de AS3812 con adición de un sitio de restricción para facilitar la sub-clonación del producto de PCR:

AoPLA1: TGAGGATCCATCATGAAGAACATCTTCG

pYESrev: gggcgtaatgtaaagcggtac

La amplificación por PCR se llevó a cabo usando Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix (ABgene, Surrey, U.K.) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando una temperatura de acoplamiento de 52°C para los primeros 5 ciclos y de 62°C para los últimos 25 ciclos, y un tiempo de extensión de 1,5 minutos.

El fragmento de PCR fue restringido con BamHI y XbaI y clonado en el vector de expresión pMStr57 de *Aspergillus* (descripto en el Ejemplo 1) usando técnicas convencionales. El gen que codifica la fosfolipasa de la construcción de

expresión de *Aspergillus* resultante pMStr71, se secuenció y la secuencia estaba completamente de acuerdo con la que se había determinado previamente para el inserto de AS3812.

La cepa de *Aspergillus oryzae* BECh2 (WO 00/39322) fue transformada con pMStr71 usando técnicas convencionales (T. Christensen et al., 1988). Se cultivaron transformantes en un medio de DAP2C-1 agitado a 270 RPM a 77°C durante 4 días y se monitoreó la expresión de fosfolipasa mediante SDS-PAGE.

Ejemplo 10: Purificación y determinación del procesamiento de péptido

La fosfolipasa de *Aspergillus oryzae* de la fermentación del ejemplo 9 se filtró a través de un filtro esterilizado de 0,22 μ Seitz-EKS obtenido en Pall Corporation (Pall SeitzSchenk Filter Systems GMBH Pianiger Str. 137 D-55543 Bad Kreuznach, Alemania). La solución filtrada con esterilización se ajustó luego a pH 4,7 usando ácido acético diluido. Luego se ajustó la fuerza iónica del sobrenadante de fermentación de modo que la concentración de sal fuera baja, y que la fuerza iónica estuviera por debajo de 4 mSi. La purificación de la proteína de PLA2 deseada se obtuvo por cromatografía de intercambio catiónico usando SP sepharose fase Flow matriz obtenida en Amersham-Pharmacia (Suecia). La matriz de intercambio catiónico se lavó y se pre-equilibró con 50 mM de buffer de acetato de sodio de pH 4,7 (Buffer A) sobre una columna XK26 obtenida en Amersham Pharmacia. El sobrenadante de fermentación que contenía la PLA2 ajustada en su pH y en la fuerza iónica, se aplicó luego a la columna. Luego el material no adherido se sacó con el buffer A hasta sacar todo el material absorbente de UV, que se monitoreó mediante un detector de UV unido al equipo colector de la fracción. Las proteínas adheridas fueron luego eluidas con un gradiente lineal de sal usando el Buffer B que contenía 1 M de cloruro de sodio como sal en 50 mM de buffer de acetato de sodio de pH 4,7. El volumen total del gradiente lineal alcanzó una concentración de sal 1M que era de alrededor de

500 ml (de la columna 10). Se recogieron cada una de las fracciones 10 ml durante la elución. Todas las fracciones se ensayaron para determinar la actividad de fosfolipasa usando lecitina como sustrato obtenida en Sigma Chemical. Los ácidos grasos liberados de la lecitina por incubación con la fosfolipasa fueron detectados usando un equipo NEFA C obtenido en Waco Chemicals. Las fracciones que contenían actividad de fosfolipasa fueron luego controladas para determinar la pureza de la proteína usando la técnica convencional de SDS-PAGE. Se reunieron las fracciones que contenían una sola banda de la PLA2 deseada que mostraban un peso molecular de alrededor de 16 kDa, lo cual se determinó por comparación con los modelos de peso molecular de Amersham-Pharmacia.

La identidad de la proteína pura se confirmó determinando la secuencia N-terminal, que era idéntica a la secuencia del aminoácido (aa) 37-45 de la SEC ID NO: 7. Adicionalmente, la masa del péptido se determinó por análisis de espectro de masa. La PLA2 de *Aspergillus* activa purificada proporcionó dos masas, 14114 y 14242. Estas masas moleculares indican un proceso adicional en el término C, que coincide con la disociación entre los aminoácidos 121 y 122 en la SEC ID NO: 7, como secuencia peptídica del aminoácido 37 a 121 y tiene una masa teórica de 14114,11 Da y la disociación entre los aminoácidos 122 y 123, que pronostican la secuencia peptídico del aminoácido 37-123 con una masa teórica de 14242,29 Da.

Ejemplo 11: Expresión de la fosfolipasa incompletamente procesada de *Aspergillus oryzae* y *Fusarium venenatum*

El procesamiento de *Aspergillus oryzae* PLA2 (AoPLA2) y tanto en el término N como C se produce en residuos básicos sensibles o múltiples (lys o arg), que son típicos de los sitios de disociación de las maturasas de tipo de Kexina, que son a menudo responsables del procesamiento de los pro-péptidos

(Jalving, R., et al (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66: 363-368). Para determinar el efecto del procesamiento sobre la actividad de AoPLA2 y FvPLA2, las enzimas se expresaron en una cepa de *Aspergillus oryzae* con eficiencia de Kexina. El procesamiento se verificó mediante SDS-PAGE, y se midió la actividad de fosfolipasa para los cultivos de cepa que expresaban AoPLA2 y FvPLA2 tanto en las bases con deficiencia de Kexina como las de tipo salvaje.

Una cepa de *Aspergillus oryzae* deficiente en Kexina se construyó mediante una interrupción del gen *kexB* de *A.oryzae* (EMBL: AB056727) mediante métodos establecidos en el arte tal como los descriptos en la WO 98/12300 y en la Patente Norteamericana US6013452. La interrupción de *kexB* fue confirmada por el análisis del borrón Southern y por el monitoreo de la expresión de péptidos en los cuales se sabe que el *kexB* es responsable de la maduración. La cepa de *kexB* fue transformada con la construcción de expresión AoPLA2 descripta en el Ejemplo 9, y con la construcción de expresión FvPLA2 descripta en el Ejemplo 4. Estas cepas se fermentaron en YP+2%G a 30°C, junto con las cepas de expresión de *kexB'* tanto para AoPLA2 como para FvPLA2 descriptas en los Ejemplos 9 y 4, y las cepas no transformadas como controles. Las cepas que expresan AoPLA2 se agitaron a 200RPM durante 4 días, mientras las cepas que expresaban FvPLA2 se agitaron a 275 RPM durante 3 días. La expresión y procesamiento de las fosfolipasas se verificaron mediante SDS-PAGE.

En el análisis de SDS-PAGE, la AoPLA2 se resolvió como una banda sencilla distinta tanto en las cepas *kexB* como en las *kexB'*. Cuando se expresan en la cepa *kexB+*, la AoPLA2, corre a ca. 16 kDa, lo cual coincide con la migración observada previamente para la AoPLA2 completamente procesada (Ejemplo 10), mientras que en la cepa *kexB'*, la AoPLA2 corre a ca. 27-28 kDa que coincide con una falta de procesamiento o con un procesamiento incompleto. Cuando se expresa en la cepa *kexB'* la FvPLA2 se resuelve como dos bandas

con pesos moleculares aparentes de 17 kDa y 14 kDa. La banda de 14 kDa corresponde al péptido procesado (Ejemplo 5), mientras que el péptido de 17 kDa, es una forma parcialmente procesada. Cuando se expresa en la cepa kexB' la FvPLA2 corre como una sola banda a ca. 18-19 kDa, un tamaño que coincide con un procesamiento incompleto. No se observaron bandas similares en ninguna de las muestras de control de las cepas no transformadas. Las intensidades de banda relativa sugirieron que la expresión de AoPLA2 en la cepa kexB' fue de 1/5 a 1/10 de nivel de la cepa kexB+, mientras que la expresión de FvPLA2 en la cepa kexB- fue igual a 1/2 del nivel de la cepa kexB+.

La actividad de las fosfolipasas producidas mediante cada cepa se determinó en el ensayo LEU y se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7

Genotipo de la cepa			Actividad LEU/ml
KexB	FvPLA2	AoPLA2	
+	-	-	0
-	-	-	0
+	+	-	38
-	+	-	0
+	-	+	56
-	-	+	0

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S

<120> Expresión de fosfolipasa

<130> 10342.200-AR

<160> 16

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 211

<212> PRT

<213> Tuber borchii

<400> 1

Met Val Lys Ile Ala Ala Ile Ile Leu Leu Met Gly Ile Leu Ala Asn

1 5 10 15

Ala Ala Ala Ile Pro Val Ser Glu Pro Ala Ala Leu Asn Lys Arg Gly

20 25 30

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S

<120> Expresión de fosfolipasa

<130> 10342.200-AR

<160> 16

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 211

<212> PRT

<213> Tuber borchii

<400> 1

Met Val Lys Ile Ala Ala Ile Ile Leu Leu Met Gly Ile Leu Ala Asn

1

5

10

15

Ala Ala Ala Ile Pro Val Ser Glu Pro Ala Ala Leu Asn Lys Arg Gly

20

25

30

Asn Ala Glu Val Ile Ala Glu Gln Thr Gly Asp Val Pro Asp Phe Asn

35 40 45

Thr Gln Ile Thr Glu Pro Thr Gly Glu Gly Asp Arg Gly Asp Val Ala

50 55 60

Asp Glu Thr Asn Leu Ser Thr Asp Ile Val Pro Glu Thr Glu Ala Ala

65 70 75 80

Ser Phe Ala Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Leu Ser Pro Val Ser Asp

85 90 95

Thr Asp Arg Leu Leu Tyr Ser Thr Ala Met Pro Ala Phe Leu Thr Ala

100 105 110

Lys Arg Asn Lys Asn Pro Gly Asn Leu Asp Trp Ser Asp Asp Gly Cys

115 120 125

Ser Lys Ser Pro Asp Arg Pro Ala Gly Phe Asn Phe Leu Asp Ser Cys

130 135 140

Lys Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys Lys Gln His Arg Phe

145 150 155 160

Thr Glu Ala Asn Arg Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu

165 170 175

Tyr Asn Glu Cys Ala Lys Tyr Ser Gly Leu Glu Ser Trp Lys Gly Val

180 185 190

Ala Cys Arg Lys Ile Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Ala Val Arg Thr Phe

195 200 205

Gly Trp Leu

210

<210> 2

<211> 588

<212> ADN

<213> Verticillium dahliae

<220>

<221> característica misc

<222> (25)..(26)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> CDS

<222> (72)..(587)

<400> 2

cagtttgaag tcccgcccccc tgctnnntctt cctgcttc cccgtccagt ctttgggatt 60

ttcctctcat c atg aag ttc aac gca att ctc ctg gcc ctc gtg cct gcc 110

Met Lys Phe Asn Ala Ile Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala

1 5 10

gcc ctg gct ctg ccc acc acc gac gag ggc cag acc ccc aag ctc gcc 158

Ala Leu Ala Leu Pro Thr Thr Asp Glu Ala Gln Thr Pro Lys Leu Ala

15 20 25

gct cgc cag agc atc acg gcc gtc acc gac agc ctg tcc ttc tcc ctg 206

Ala Arg Gln Ser Ile Thr Ala Val Thr Asp Ser Leu Ser Phe Ser Leu

30 35 40 45

acg ctg cct cag ttc acc acg cgc cgc aac aac cgc aac ccc gcc aac 254

Thr Leu Pro Gln Phe Thr Thr Arg Arg Asn Asn Arg Asn Pro Ala Asn

50 55 60

ctc gac tgg agc tcc gac ggc tgc aca acg tct cct gac aac cca ttc 302

Leu Asp Trp Ser Ser Asp Gly Cys Thr Thr Ser Pro Asp Asn Pro Phe

65 70 75

gga ttc ccc ttt gtg ccg gcc tgc cac cgc cac gac ttt ggc tac cac 350

Gly Phe Pro Phe Val Pro Ala Cys His Arg His Asp Phe Gly Tyr His

80 85 90

aac ttc cgc gcc cag acc cgc ttc acc gag agc aac aag ctc cgc atc 398

Asn Phe Arg Ala Gln Thr Arg Phe Thr Glu Ser Asn Lys Leu Arg Ile

95 100 105

gac aac cag ttc agg acc gat ctg agg ttc cag tgc cag tct tcg agc 446

Asp Asn Gln Phe Arg Thr Asp Leu Arg Phe Gln Cys Gln Ser Ser Ser

110 115 120 125

gtg cgc ggc gtg tgc aac gcc ctg gcg gac gtc tac tac tct gcc gtc 494

Val Arg Gly Val Cys Asn Ala Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Ser Ala Val

130 135 140

cgg gcg ttc ggc ggt gac gac gcc acc ccc ggc aag agg gac gag cac 542

Arg Ala Phe Gly Gly Asp Asp Ala Thr Pro Gly Lys Arg Asp Glu His

145 150 155

tcg gaa ctc gtc ggc atc tac gac gag aag gtc ggc atc tac gat a 588

Ser Glu Leu Val Gly Ile Tyr Asp Glu Lys Val Gly Ile Tyr Asp

160 165 170

<210> 3

<211> 172

<212> PRT

<213> Verticillium dahliae

<400> 3

Met Lys Phe Asn Ala Ile Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Ala Leu Ala

1 5 10 15

Leu Pro Thr Thr Asp Glu Ala Gln Thr Pro Lys Leu Ala Ala Arg Gln

20 25 30

Ser Ile Thr Ala Val Thr Asp Ser Leu Ser Phe Ser Leu Thr Leu Pro

35 40 45

Gln Phe Thr Thr Arg Arg Asn Asn Arg Asn Pro Ala Asn Leu Asp Trp

50 55 60

Ser Ser Asp Gly Cys Thr Thr Ser Pro Asp Asn Pro Phe Gly Phe Pro

65 70 75 80

Phe Val Pro Ala Cys His Arg His Asp Phe Gly Tyr His Asn Phe Arg

85 90 95

Ala Gin Thr Arg Phe Thr Glu Ser Asn Lys Leu Arg Ile Asp Asn Gln

100 105 110

Phe Arg Thr Asp Leu Arg Phe Gln Cys Gln Ser Ser Ser Val Arg Gly

115 120 125

Val Cys Asn Ala Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Ser Ala Val Arg Ala Phe

130 135 140

Gly Gly Asp Asp Ala Thr Pro Gly Lys Arg Asp Glu His Ser Glu Leu

145 150 155 160

Val Gly Ile Tyr Asp Glu Lys Val Gly Ile Tyr Asp

165 170

<210> 4

<211> 185

<212> PRT

<213> Neurospora crassa

<400> 4

Met Lys Phe Phe Ser Ala Leu Ala Leu Ser Ser Leu Leu Pro Thr Ala

1 5 10 15

Ala Trp Ala Trp Thr Gly Ser Glu Ser Asp Ser Thr Gly Ala Asp Ser

20 25 30

Leu Phe Arg Arg Ala Glu Thr Ile Gln Gln Thr Thr Asp Arg Tyr Leu

35 40 45

Phe Arg Ile Thr Leu Pro Gln Phe Thr Ala Tyr Arg Asn Ala Arg Ser

50 55 60

Pro Ala Thr Leu Asp Trp Ser Ser Asp Ser Cys Ser Tyr Ser Pro Asp

65 70 75 80

Asn Pro Leu Gly Phe Pro Phe Ser Pro Ala Cys Asn Arg His Asp Phe

85 90 95

Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys Ala Gln Ser Arg Phe Thr Asp Asn Asn Lys

100 105 110

Leu Lys Ile Asp Gly Asn Phe Lys Thr Asp Leu Tyr Tyr Gln Cys Asp

115 120 125

Thr His Gly Tyr Gly Ser Thr Cys His Ala Leu Ala Asn Val Tyr Tyr

130 135 140

Ala Ala Val Arg Glu Phe Gly Arg Thr Lys Gly Glu Leu Gln Glu Glu

145 150 155 160

Tyr Asp Leu Leu Leu Ala His Tyr Asn Glu Leu Val Ala Glu Ala Ile

165 170 175

Ala Lys Gly Glu Asp Pro Leu Tyr Tyr

180 185

<210> 5

<211> 169

<212> PRT

<213> Helicosporium sp.

<400> 5

Met Lys Ser Phe Thr Phe Val Val Leu Ala Leu Leu Pro Phe Ser Ser

1 5 10 15

Ala Leu Pro Phe Gly Leu Phe His Arg Gly Gly Ile Ala Ser Arg Ala

20 25 30

Thr Ile Glu Glu Thr Thr Asp Thr Leu Leu Phe Ser Thr Pro Ile Ala

35 40 45

Gln Phe Glu Ala Ala Arg Asn Ala Gln Asn Pro Ser Thr Leu Asp Trp

50 55 60

Ser Ser Asp Gly Cys Ser Ser Pro Asp Asp Pro Phe Gly Phe Asp

65 70 75 80

Phe Leu Ser Ser Cys His Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys

85 90 95

Lys Gln Asn Arg Phe Thr Ala Pro Asn Lys Ala Arg Ile Asp Thr Asn

100 105 110

Phe Lys Thr Asp Met Tyr Asn Gln Cys Asn Thr Glu Ser Asn Ile Phe

115 120 125

Thr Arg Ala Ala Cys Lys Ala Val Ala Asp Ile Tyr Tyr Glu Ala Val

130 135 140

Lys Thr Phe Gly Ser Lys Lys Arg Ala Ala Glu Ala Leu Ala Ala Arg

145 150 155 160

Gln Met Glu Glu Asn Val Ala Lys Ala

165

<210> 6

<211> 942

<212> DNA

<213> Aspergillus oryzae

<220>

<221> CDS

<222> (61)..(726)

<400> 6

cgcaaggatc acatctactt ctatggctt attctgtccg agtgcttagcc acttatcatc 60

atg aag aac atc ttc gtt gcc act ttg ggc ctg ttc gcc gca gtt tcg 108

Met Lys Asn Ile Phe Val Ala Thr Leu Gly Leu Phe Ala Ala Val Ser

1 5 10 15

tct gcc ttg ccc tac aca acc cct gtc aat gac aat ccc atc tct gct 156

Ser Ala Leu Pro Tyr Thr Pro Val Asn Asp Asn Pro Ile Ser Ala

20 25 30

tta caa gca cgc gcg aca aca tgc tcg gcc aag gcc acg gat aac ctc 204

Leu Gln Ala Arg Ala Thr Thr Cys Ser Ala Lys Ala Thr Asp Asn Leu

35 40 45

atc ttc aag gtc tcc atg aag acc ttc cag aag gcg cgc aag gcc aag 252

Ile Phe Lys Val Ser Met Lys Thr Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ala Lys

50 55 60

aac ccc tcc aag tgc aac tgg tca tcg gac aac tgc tcc aag tca ccc 300
Asn Pro Ser Lys Cys Asn Trp Ser Ser Asp Asn Cys Ser Lys Ser Pro
65 70 75 80

gat aag ccc gat gga tac aac ttc atc ccc agc tgc caa aga cac gat 348
Asp Lys Pro Asp Gly Tyr Asn Phe Ile Pro Ser Cys Gln Arg His Asp
85 90 95

ttc ggc tac cgg aac acg aag aag cag aag cgc ttc aca aag gcc atg 396
Phe Gly Tyr Arg Asn Thr Lys Lys Gln Lys Arg Phe Thr Lys Ala Met
100 105 110

aag aag cgc att gac gac aac ttc aag aag gat ctc tac aag tac tgc 444
Lys Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr Lys Tyr Cys
115 120 125

agc caa ttc tcg ggc tgg agc tca tgg aag gga gtg gag tgc cgt cgc 492
Ser Gln Phe Ser Gly Trp Ser Ser Trp Lys Gly Val Glu Cys Arg Arg
130 135 140

ctt gcg gat gtc tac tat act gct gtc cgc cac ttt ggc aag cgt gat 540
Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Ala Val Arg His Phe Gly Lys Arg Asp
145 150 155 160

gaa gcg ctt gag ttt gac cct gag gtt gag ttc gag aag cgt gat gag 588
Glu Ala Leu Glu Phe Asp Pro Glu Val Glu Phe Glu Lys Arg Asp Glu
165 170 175

gtg gcc gat gtc cag cct gac gaa ttt gat aac ttt gac ggt lct gaa 636
Val Ala Asp Val Gln Pro Asp Glu Phe Asp Asn Phe Asp Gly Ser Glu
180 185 190

gtt gac cct gat atc gag ggc cag gtc att ccc gaa gtt ctt gaa gat 684
Val Asp Pro Asp Ile Glu Gly Gln Val Ile Pro Glu Val Leu Glu Asp
195 200 205

gat gga gtg gat gtg gag aac ctc gac gat att gaa aac ctg 726
Asp Gly Val Asp Val Glu Asn Leu Asp Asp Ile Glu Asn Leu
210 215 220

taggtttcg gcattggctc tacacttgc aaatgggtcg tcataatcca ttgaaagccg 786

gaggaggagg gaaatcaagg catctttgg ttgtcagtaa ctttgagtgc ctagttgtg 846

aattgtttt tgaggttcta ttgaattct gctttgttc aatcttagt cttccctacgt 906

tgttgtcatt taaaaatgga caggagtatc tgtgag 942

<210> 7

<211> 222

<212> PRT

<213> Aspergillus oryzae

<400> 7

Met Lys Asn Ile Phe Val Ala Thr Leu Gly Leu Phe Ala Ala Val Ser

1 5 10 15

Ser Ala Leu Pro Tyr Thr Thr Pro Val Asn Asp Asn Pro Ile Ser Ala

20 25 30

Leu Gln Ala Arg Ala Thr Thr Cys Ser Ala Lys Ala Thr Asp Asn Leu

35 40 45

Ile Phe Lys Val Ser Met Lys Thr Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ala Lys

50 55 60

Asn Pro Ser Lys Cys Asn Trp Ser Ser Asp Asn Cys Ser Lys Ser Pro

65 70 75 80

Asp Lys Pro Asp Gly Tyr Asn Phe Ile Pro Ser Cys Gln Arg His Asp

85 90 95

Phe Gly Tyr Arg Asn Thr Lys Lys Gln Lys Arg Phe Thr Lys Ala Met

100 105 110

Lys Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr Lys Tyr Cys
115 120 125

Ser Gln Phe Ser Gly Trp Ser Ser Trp Lys Gly Val Glu Cys Arg Arg
130 135 140

Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Thr Ala Val Arg His Phe Gly Lys Arg Asp
145 150 155 160

Glu Ala Leu Glu Phe Asp Pro Glu Val Glu Phe Glu Lys Arg Asp Glu
165 170 175

Val Ala Asp Val Gln Pro Asp Glu Phe Asp Asn Phe Asp Gly Ser Glu
180 185 190

Val Asp Pro Asp Ile Glu Gly Gln Val Ile Pro Glu Val Leu Glu Asp
195 200 205

Asp Gly Val Asp Val Glu Asn Leu Asp Asp Ile Glu Asn Leu

210 215 220

<210> 8

<211> 249

<212> PRT

<213> Neurospora crassa

<400> 8

Met Lys Pro Phe Phe Leu Ile Ser Leu Leu Val Thr Val Phe Met Ser

1 5 10 15

Leu Met Leu Ala Thr Thr Ala Gln Pro Ser Leu Pro Leu Asn Asn Arg

20 25 30

Arg Glu Leu Ala Glu His Pro Pro Val Lys Gly Asn Pro Pro Asn Thr

35 40 45

Gly Tyr Ala Leu Asp Trp Cys Lys Tyr Thr Ala Gly Met Leu Phe Gln

50 55 60

Trp Asp Leu Pro Thr Phe Ile Lys His Arg Glu Ala Asn Phe Ser Leu

65 70 75 80

Gly Arg Leu Thr Trp Asp Trp Ser Ser Asp Gly Cys Thr His Val Pro

85 90 95

Asp Asn Pro Val Gly Phe Pro Phe Lys Pro Ala Cys Gln Arg His Asp

100 105 110

Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Gln Val Gln Phe His Phe Thr Pro Arg Ala

115 120 125

Arg Trp Lys Ile Asp Glu Asn Phe Leu Lys Glu Met Lys Phe Gln Cys

130 135 140

Ile Gly His Asn Ile Phe Asn Ala Cys His Phe Met Ala His Val Tyr

145 150 155 160

His Trp Gly Val Arg Thr Phe Tyr Lys Gly His Glu Gln Tyr Arg Glu

165 170 175

Ser Glu Pro Ser His Lys Met Met Asp Thr Met Val Ala Ser Glu Ser

180 185 190

Ser Asp Val Phe Asp Gly Met Asp Ala Asp Glu Ala Arg Asp Ala Leu

195 200 205

Asn Pro Tyr Leu Ser Glu Glu Lys Thr Lys Glu Tyr Tyr Asp Arg Ala

210 215 220

Leu Ala Arg Tyr Asn Lys Cys Val Glu Glu Ala Met Ala Gln Gly Ile

225 230 235 240

Asp Leu Gln Lys Tyr Trp Ala Ala Phe

245

<210> 9

<211> 832

<212> DNA

<213> Tuber albidum

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(426)

<220>

<221> CDS

<222> (476)..(680)

<400> 9

a atg gtc aag att gct gcc att gtc ctc cta atg gga att cta gcc aat 49

Met Val Lys Ile Ala Ala Ile Val Leu Leu Met Gly Ile Leu Ala Asn

1 5 10 15

gct gcc gcc atc cct gtc agc gag cca gca gcc ctg gcg aag cgt gga 97

Ala Ala Ala Ile Pro Val Ser Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Arg Gly

20 25 30

aac gct gag gtc att gct gaa caa act ggt gat gtc ccg gat ttc aac 145

Asn Ala Glu Val Ile Ala Glu Gln Thr Gly Asp Val Pro Asp Phe Asn

35 40 45

actcaaattacaaggccaactgggagggagggacgctgggatgtggatgtc 193

Thr Gln Ile Thr Glu Pro Thr Gly Glu Gly Asp Arg Gly Asp Val Val

50 55 60

gac gaa acc gat ttg tcc acg gat att gtc cca gag acc gag gct gct 241

Asp Glu Thr Asp Leu Ser Thr Asp Ile Val Pro Glu Thr Glu Ala Ala

65 70 75 80

tcc ttc gcc gct agt tca gta tct gca gcc tca cca gca tct gac acc 289
Ser Phe Ala Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ser Asp Thr

85 90 95

gac agg ctt ctc tac tca acc tcc atg ccc gcc ttc ttg act gct aag 337
Asp Arg Leu Leu Tyr Ser Thr Ser Met Pro Ala Phe Leu Thr Ala Lys

100 105 110

cgc aat aag aac ccc ggc aac ttg gac tgg agc gat gat gga tgc agc 385
Arg Asn Lys Asn Pro Gly Asn Leu Asp Trp Ser Asp Asp Gly Cys Ser

115 120 125

aac tcc ccg gac agg cct gca ggg ttt aac ttc ctt gac tc 426
Asn Ser Pro Asp Arg Pro Ala Gly Phe Asn Phe Leu Asp Ser

130 135 140

gtaaaggcctc cttcatttat gctatctaca ttcaactata ttcaaacag c tgc aag 482
Cys Lys

cgt cac gac ttc ggg tac cgc aac tac aag aag cag cgc cgc ttc aca 530
Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys Lys Gln Arg Arg Phe Thr

145 150 155 160

gag cct aat cgc aag cgc att gat gac aat ttc aag aag gac cta tat 578

Glu Pro Asn Arg Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr

165 170 175

aat gag tgc gcc aag tac tct ggc ctc caa tcc tgg aaa ggt gtt gcc 626

Asn Glu Cys Ala Lys Tyr Ser Gly Leu Gln Ser Trp Lys Gly Val Ala

180 185 190

tgc cgc aaa atc gcg aac act tac tac gat gct gta cgc tcc ttc ggt 674

Cys Arg Lys Ile Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Ala Val Arg Ser Phe Gly

195 200 205

tgg ttg taaaatgtgcg gaagagatata caagtggatat cgaggaagag gatggtaaaa 730

Trp Leu

210

gagctgagag gtggatttct ttacattccg caatggctac tacagaagaa ctgtgctct 790

caaatttaat ctcattttg tgcgtatcta tccactctag aa 832

<210> 10

<211> 210

<212> PRT

<213> Tuber albidum

<400> 10

Met Val Lys Ile Ala Ala Ile Val Leu Leu Met Gly Ile Leu Ala Asn

1 5 10 15

Ala Ala Ala Ile Pro Val Ser Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Arg Gly

20 25 30

Asn Ala Glu Val Ile Ala Glu Gln Thr Gly Asp Val Pro Asp Phe Asn

35 40 45

Thr Gln Ile Thr Glu Pro Thr Gly Glu Gly Asp Arg Gly Asp Val Val

50 55 60

Asp Glu Thr Asp Leu Ser Thr Asp Ile Val Pro Glu Thr Glu Ala Ala

65 70 75 80

Ser Phe Ala Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ser Asp Thr

85 90 95

Asp Arg Leu Leu Tyr Ser Thr Ser Met Pro Ala Phe Leu Thr Ala Lys

100 105 110

Arg Asn Lys Asn Pro Gly Asn Leu Asp Trp Ser Asp Asp Gly Cys Ser
115 120 125

Asn Ser Pro Asp Arg Pro Ala Gly Phe Asn Phe Leu Asp Ser Cys Lys
130 135 140

Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys Lys Gln Arg Arg Phe Thr
145 150 155 160

Glu Pro Asn Arg Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr
165 170 175

Asn Glu Cys Ala Lys Tyr Ser Gly Leu Gln Ser Trp Lys Gly Val Ala
180 185 190

Cys Arg Lys Ile Ala Asn Thr Tyr Asp Ala Val Arg Ser Phe Gly
195 200 205

Trp Leu
210

<210> 11

<211> 961

<212> DNA

<213> Verticillium tenerum

<220>

<221> CDS

<222> (5)..(628)

<400> 11

caac atg aag acc acc gct gtt ctg tcc ctc gcc atg ctc cag gcc acc 49

Met Lys Thr Thr Ala Val Leu Ser Leu Ala Met Leu Gln Ala Thr

1 5 10 15

tgg gcc tcg ccc gtg gcc aag cgc cag aac gac gtc tcc ctc gtc gac 97

Trp Ala Ser Pro Val Ala Lys Arg Gln Asn Asp Val Ser Leu Val Asp

20 25 30

aac tac atg ttc ggc atc tcg ctg ccc acc ttc tcc aac cac cac tcc 145

Asn Tyr Met Phe Gly Ile Ser Leu Pro Thr Phe Ser Asn His His Ser

35 40 45

aac agg aac ccc cct cgc ctg gac tgg acc acc gac ggc tgc acc tcg 193

Asn Arg Asn Pro Pro Arg Leu Asp Trp Thr Asp Gly Cys Thr Ser

50 55 60

tcg ccc aac aac ccg ctc gcc ttc ccc ttc ctg ccc gcc tgc cac cgc 241
Ser Pro Asn Asn Pro Leu Gly Phe Pro Phe Leu Pro Ala Cys His Arg

65 70 75

cac gac ttt ggc tac cag aac ttc cgc atc cag agc cgc ttc acc cag 289
His Asp Phe Gly Tyr Gln Asn Phe Arg Ile Gln Ser Arg Phe Thr Gln

80 85 90 95

agc aac aag ctc cgc atc gac gac aag ttc aag gag gac ctc tac cac 337
Ser Asn Lys Leu Arg Ile Asp Asp Lys Phe Lys Glu Asp Leu Tyr His

100 105 110

cag tgc gac ggc cac tgg gcc tgg gtt gcc tgc gct gcc ctc gcc gag 385
Gln Cys Asp Gly His Trp Ala Trp Val Ala Cys Ala Ala Leu Ala Glu

115 120 125

gtc tac tac gcc gcc gtc cgc gcc ttc ggc ggt ggt gac gcc acc ccg 433
Val Tyr Tyr Ala Ala Val Arg Ala Phe Gly Gly Asp Ala Thr Pro

130 135 140

gga cgc atg cac gtc gcc gtc ttc ggc cag acc cag gcc gag cac gac 481
Gly Arg Met His Val Ala Val Phe Gly Gln Thr Gln Ala Glu His Asp

145 150 155

gcc ctc gtc tcc atc tac gag gag aag ctc gcg gcc tac gag gct gcc 529

Ala Leu Val Ser Ile Tyr Glu Glu Lys Leu Ala Ala Tyr Glu Ala Ala

160 165 170 175

gtc gcc gag gcc gag gcc cgc ggc gag atc ccc cac gtc gag gag acc 577

Val Ala Glu Ala Glu Ala Arg Gly Glu Ile Pro His Val Glu Glu Thr

180 185 190

ctc ccc gag gag cct gcc gcc gag gag ccc gcc gcc gag gag gag cag 625

Leu Pro Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Glu Gln

195 200 205

aag taaaacacgag ccccttttag gaccgactag ctgggtgtcg ctgggtttagg 678

Lys

ctgagctgag tgacggggag gcacgaaaga gagcaatgca tcagacaggc tggAACATGC 738

cTTGtCTGA GTGATGGATG GACTTGTATGG ACTTGTATGG CTTGGATGCA TTTATGATAc 798

cGCCAGTGTG GACTGGCAGA GCGAGCGACT TGATTGAA TGATGAA GGACGGATGT 858

CCCGAGGTGG ATAAGGGATG CCTTATCACC AACTCTCA TGTATATATT GTACTGCGCA 918

GAGAAGCGCG CCCCCAAAAAA TGGATTGATT CTGATGAGA CGT 961

<210> 12

<211> 208

<212> PRT

<213> Verticillium tenerum

<400> 12

Met Lys Thr Thr Ala Val Leu Ser Leu Ala Met Leu Gln Ala Thr Trp

1 5 10 15

Ala Ser Pro Val Ala Lys Arg Gln Asn Asp Val Ser Leu Val Asp Asn

20 25 30

Tyr Met Phe Gly Ile Ser Leu Pro Thr Phe Ser Asn His His Ser Asn

35 40 45

Arg Asn Pro Pro Arg Leu Asp Trp Thr Thr Asp Gly Cys Thr Ser Ser

50 55 60

Pro Asn Asn Pro Leu Gly Phe Pro Phe Leu Pro Ala Cys His Arg His

65 70 75 80

Asp Phe Gly Tyr Gln Asn Phe Arg Ile Gln Ser Arg Phe Thr Gln Ser

85 90 95

Asn Lys Leu Arg Ile Asp Asp Lys Phe Lys Glu Asp Leu Tyr His Gln

100 105 110

Cys Asp Gly His Trp Ala Trp Val Ala Cys Ala Ala Leu Ala Glu Val

115 120 125

Tyr Tyr Ala Ala Val Arg Ala Phe Gly Gly Asp Ala Thr Pro Gly

130 135 140

Arg Met His Val Ala Val Phe Gly Gln Thr Gln Ala Glu His Asp Ala

145 150 155 160

Leu Val Ser Ile Tyr Glu Glu Lys Leu Ala Ala Tyr Glu Ala Ala Val

165 170 175

Ala Glu Ala Glu Ala Arg Gly Glu Ile Pro His Val Glu Glu Thr Leu

180 185 190

Pro Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Glu Gln Lys

195 200 205

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> TbPLA1 primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(9)

<223> BamHI site

<400> 13

caaggatcca aaatggtcaa gattgctgc

29

<210> 14

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> TbPLA2 primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(9)

<223> Xhol site

<400> 14

tgcctcgagt ttttctaga gtggatagat agac

34

<210> 15

<211> 690

<212> DNA

<213> Fusarium venenatum

<220>

<221> CDS

<222> (49)..(597)

<400> 15

cagtttggt tcitccitc ctatccatc acttctagta tcttcaag atg aag ttc 57

Met Lys Phe

1

agc gct acc att ctt tca ctc ctc ccg gca gtt ctc gcc ctg ccc aca 105

Ser Ala Thr Ile Leu Ser Leu Leu Pro Ala Val Leu Ala Leu Pro Thr

5 10 15

ggc gaa gat gca tct gtc tca aag cgc cag agc gtg aac aca gtg aca 153

Gly Glu Asp Ala Ser Val Ser Lys Arg Gln Ser Val Asn Thr Val Thr

20 25 30 35

gat cag ctc ctc ttc agc gtc aca ctc cca caa ttc act gct cgt cgt 201

Asp Gln Leu Leu Phe Ser Val Thr Leu Pro Gln Phe Thr Ala Arg Arg

40 45 50

aac gcc cgt gat cct ccc act gtc gac tgg acc tct gac ggt tgc act 249

Asn Ala Arg Asp Pro Pro Thr Val Asp Trp Thr Ser Asp Gly Cys Thr

55 60 65

tcc tcg ccc gac aac cct ttc ggc ttc cct ttt atc cct gcc tgc aac 297

Ser Ser Pro Asp Asn Pro Phe Gly Phe Pro Phe Ile Pro Ala Cys Asn

70 75 80

cgt cac gac ttt ggc tac cac aac tac cgc gcc cag agc cgc ttc acc 345

Arg His Asp Phe Gly Tyr His Asn Tyr Arg Ala Gln Ser Arg Phe Thr

85 90 95

gtg agc gcc aag tcc cgc atc gac aac aac ttc aag acc gat ttg tac 393

Val Ser Ala Lys Ser Arg Ile Asp Asn Asn Phe Lys Thr Asp Leu Tyr

100 105 110 115

ttc caa tgc caa tcc tcc agt gtt tct ggt gtc tgc aga gca ctt gcc 441
Phe Gln Cys Gln Ser Ser Ser Val Ser Gly Val Cys Arg Ala Leu Ala

120 125 130

gac gtc tac ttc gcc gcg gtt aga gct ttt ggc ggg gat gat gct act 489
Asp Val Tyr Phe Ala Ala Val Arg Ala Phe Gly Gly Asp Asp Ala Thr

135 140 145

cct ggc aag aga gat gag gcc ctt gta aag gag tac gaa aag aag gta 537
Pro Gly Lys Arg Asp Glu Ala Leu Val Lys Glu Tyr Glu Lys Lys Val

150 155 160

gaa gtc tac aac aag ctt gtt gaa gag gct cag aag aag ggt gat ctc 585
Glu Val Tyr Asn Lys Leu Val Glu Glu Ala Gln Lys Lys Gly Asp Leu

165 170 175

cct cgc ctt gac tagagtggtt caaaaagcat tccttgggtt cattgtacat 637
Pro Arg Leu Asp

180

aaatccttac gatacatgag ttatgataaa tcctaaatgg cgggtgacga gct 690

<210> 16

<211> 183

<212> PRT

<213> Fusarium venenatum

<400> 16

Met Lys Phe Ser Ala Thr Ile Leu Ser Leu Leu Pro Ala Val Leu Ala

1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Glu Asp Ala Ser Val Ser Lys Arg Gln Ser Val Asn

20 25 30

Thr Val Thr Asp Gln Leu Leu Phe Ser Val Thr Leu Pro Gln Phe Thr

35 40 45

Ala Arg Arg Asn Ala Arg Asp Pro Pro Thr Val Asp Trp Thr Ser Asp

50 55 60

Gly Cys Thr Ser Ser Pro Asp Asn Pro Phe Gly Phe Pro Phe Ile Pro

65 70 75 80

Ala Cys Asn Arg His Asp Phe Gly Tyr His Asn Tyr Arg Ala Gln Ser

85 90 95

Arg Phe Thr Val Ser Ala Lys Ser Arg Ile Asp Asn Asn Phe Lys Thr

100 105 110

Asp Leu Tyr Phe Gln Cys Gln Ser Ser Ser Val Ser Gly Val Cys Arg

115 120 125

Ala Leu Ala Asp Val Tyr Phe Ala Ala Val Arg Ala Phe Gly Gly Asp

130 135 140

Asp Ala Thr Pro Gly Lys Arg Asp Glu Ala Leu Val Lys Glu Tyr Glu

145 150 155 160

Lys Lys Val Glu Val Tyr Asn Lys Leu Val Glu Glu Ala Gln Lys Lys

165 170 175

Gly Asp Leu Pro Arg Leu Asp

180

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descripto y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma cómo la misma ha de ser llevada a la práctica se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

1. Un método para producir una fosfolipasa que comprende procesar un péptido fungal expresado para disociarlo de un péptido del extremo C-terminal y/o un péptido del extremo N-terminal para obtener un péptido de núcleo con actividad de fosfolipasa donde el péptido de núcleo comprende:
 - a) la secuencia de aminoácido proporcionada por los aminoácidos 146-153 de la SEC ID NO: 1, los aminoácidos 87-94 de la SEC ID NO: 3, o los aminoácidos 79-86 de la SEC ID NO: 12; o una secuencia idéntica a cualquiera de estas secuencias de aminoácido excepto por la sustitución de un solo aminoácido con otro aminoácido; y
 - b) por lo menos dos residuos cisteína situados en el lado N-terminal de la secuencia proporcionada en a); y
 - c) por lo menos dos residuos cisteína situados en el lado C-terminal de la secuencia proporcionada en a).
2. El método de la reivindicación 1, donde el péptido expresado se expresa en una célula de un huésped fungal filamentoso transformado con ADN que codifica el péptido expresado.
3. El método de la reivindicación 2 donde la célula huésped es una célula de *Aspergillus*, *Fusarium* o *Trichoderma*, particularmente *A. oryzae*, *A. Niger*, *F. venenatum* o *T. reesei*.
4. El método de la reivindicación 2 donde el péptido expresado se procesa in vivo mediante la célula huésped.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde el péptido de núcleo tiene una longitud de 100-150 aminoácidos.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 donde la fosfolipasa tiene una actividad de fosfolipasa específica que es de por lo menos dos veces la actividad del péptido expresado antes del procesamiento.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 donde el péptido expresado deriva de *Tuber*, *Verticillium*, *Neurospora*, *Aspergillus*, o *Helicosporum*, particularmente, *T. borchii*, *T. albidum*, *V. dahliae*, *V. tenerum*, *N. crassa*, *A. oryzae*, o *Helicosporum sp.NH1*.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 donde el péptido expresado es disociado dentro de 0-18 aminoácidos en el lado N-terminal de la secuencia que está alineada con los aminoácidos 97-101 de la SEC ID NO: 1, cuando la secuencia peptídica completa expresada está alineada simultáneamente con las secuencias que se dan en las SEC ID NO.1, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 10, y SEC ID NO: 12.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 donde el péptido expresado está disociado dentro de 0-11 aminoácidos en el lado C-terminal de la secuencia que está alineada con los aminoácidos 204-209 de la SEC ID NO: 1, cuando la secuencia peptídica completa expresada está alineada simultáneamente con las secuencias que se dan en las SEC ID NO.1, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 10, y SEC ID NO: 12.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el péptido expresado está disociado dentro de los 10 aminoácidos de un sitio de procesamiento Kex2 o dentro de los 11 aminoácidos de una secuencia FG o en ambas.

11. Un método para hidrolizar un fosfolípido que comprende poner en contacto el fosfolípido con una fosfolipasa producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

12. Un método para producir queso que comprende poner en contacto la leche de queso o una fracción de leche de queso con una fosfolipasa, donde la fosfolipasa comprende:

a) la secuencia de aminoácido proporcionada por los aminoácidos 146-153 de la SEC ID NO: 1, los aminoácidos 87-94 de la SEC ID NO: 3, o los aminoácidos 79-86 de la SEC ID NO: 12; o una secuencia idéntica a cualquiera de estas secuencias de aminoácido excepto por la sustitución de un solo aminoácido con otro aminoácido; y

b) por lo menos dos residuos cisteína situados en el lado N-terminal de la secuencia proporcionada en a); y

c) por lo menos dos residuos cisteína situados en el lado C-terminal de la secuencia proporcionada en a).

13. Un método para producir queso que comprende poner en contacto la leche de queso o una fracción de la leche para el queso con una fosfolipasa producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

14. Una fosfolipasa que es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que es por lo menos 80% idéntica con los aminoácidos 91-210 en la SEC ID NO. 10 (*T. albidum*), aminoácidos 92-211 en la SEC ID NO. 1 (*T. borchii*), aminoácidos 30-137 en la SEC ID NO: 12 (*V. tenerum*), aminoácidos 38-145 en la SEC ID NO: 3 (*V. dahliae*), aminoácidos 44-151 en la SEC ID NO: 4 (*N. crassa*), aminoácidos 37-157 en la SEC ID NO: 7 (*A. oryzae*) o aminoácidos 58-168 en la SEC ID NO: 8 (*N. crassa*).

15. Una fosfolipasa que comprende:

- a) un polipéptido codificado por la fosfolipasa que codifica parte de la secuencia de ADN clonada en un plásmido que está presente en *Escherichia coli* número de depósito DSM 15442; o
- b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de los aminoácidos 29-149 de la SEC ID NO: 16 o una secuencia de aminoácido que puede obtenerse a partir de la misma por sustitución, delección y/o inserción de uno o más aminoácidos; o
- c) un análogo del polipéptido definido en (a) o (b) que:
 - i) tiene por lo menos 80% de homología con dicho polipéptido o
 - ii) es inmunológicamente reactivo con un anticuerpo creado contra dicho polipéptido en forma purificada, o
 - iii) es una variante alélica de dicho polipéptido; o
- d) un polipéptido que está codificado por una secuencia de ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones de baja rigurosidad con un filamento complementario de la secuencia de ácido nucleico de los ácidos nucleicos 133 a 495 de la SEC ID NO: 15 que codifica el polipéptido maduro o una subsecuencia del mismo que tiene por lo menos 100 nucleótidos.

16. La fosfolipasa de la reivindicación 15 que es natural de una cepa de *Fusarium* particularmente *F. venenatum*.

17. Una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la fosfolipasa de las reivindicaciones 15 o 16.

18. Una secuencia de ácido nucleico que comprende:

- a) u la secuencia de ADN parcial que codifica una fosfolipasa madura clonada en un plásmido que está presente en *Escherichia coli* DSM 15442; o
- b) la secuencia de ADN parcial que codifica una fosfolipasa madura de los ácidos nucleicos 133 a 495 de la SEC ID NO: 15.

c) un análogo de la secuencia definida en (a) o (b) que codifica una fosfolipasa y:

i) tiene por lo menos 80% de homología con dicha secuencia de ADN o

ii) se hibrida bajo alta rigurosidad con un filamento complementario de dicha secuencia de ADN o con una subsecuencia del mismo que tiene por los menos 100 nucleótidos.

iii) es una variante alelica del mismo o

d) es un filamento complementario de a), b) o c).

19. Una construcción de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de las reivindicaciones 17 y 18 ligado operativamente a una o más secuencias de control capaces de dirigir la expresión de la fosfolipasa en un huésped de expresión apropiado.

20. Un vector de expresión recombinante que comprende la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 19, un promotor, y señales de interrupción de transcripción y traducción.

21. Una célula huésped recombinante que comprende la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 20.

22. Un método para producir una fosfolipasa que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 21 bajo condiciones que conducen a la producción de la fosfolipasa, y recuperar la fosfolipasa.

23. Un método para preparar una masa o un producto horneado preparado a partir de la masa, que comprende agregar la fosfolipasa de la reivindicación 15 o la masa.

24. Una composición de masa que comprende la fosfolipasa de la reivindicación 15.

25. Una composición detergente que comprende un agente tensoactivo y la fosfolipasa de la reivindicación 15.

26. Un procedimiento para reducir el contenido de fósforo en un aceite vegetal, que comprende poner en contacto el aceite con la fosfolipasa de la reivindicación 15 en presencia de agua, y separar luego una fase acuosa del aceite.
27. Un procedimiento para producir queso que comprende tratar una composición láctea con una fosfolipasa y producir queso a partir de la composición láctea, donde la fosfolipasa es la fosfolipasa de la reivindicación 15.
28. Un procedimiento para producir queso que comprende tratar una composición láctea con una fosfolipasa y producir queso a partir de la composición láctea, donde la fosfolipasa está seleccionada del grupo que comprende la fosfolipasa PLA2 del Grupo XIII fungal/bacteriano.

p: Novozymes A/Z, and Chr. Hansen A/S

Resumen

La presente invención está relacionada con un método para producir una fosfolipasa mediante un procedimiento que expresa un péptido fangal y ciertas fosfolipasas especificadas. Además, la invención provee un método para producir queso con una fosfolipasa.

1

SEC ID NO: 1 SEQ ID NO: 10 SEQ ID NO: 8 SEQ ID NO: 4 SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 3	SEC ID NO: 1 SEC ID NO: 10 SEC ID NO: 8 SEC ID NO: 4 SEC ID NO: 5 SEC ID NO: 7 SEC ID NO: 12 SEC ID NO: 3	CONSENSO CONSENSO	(1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1)	MVKIAITILMGLANAAIPVSEPAALNIPGENAETIAEQGDPDPNTQITEPTGEGDRGDADETLSDPETEAA MKPFLISLIVFMSLMLATAQSPPLNRRCEHPPV --MKFSALALSLLEPTAWATGSESDS --MKSFTKVALLPSSALPFG --MKNIFVATGLFAAVSSALPYTTPVND ---MKTAVESLAMLO L A LA
SEC ID NO: 1 SEC ID NO: 10 SEC ID NO: 8 SEC ID NO: 4 SEC ID NO: 5 SEC ID NO: 7 SEC ID NO: 12 SEC ID NO: 3	(81) (81) (42) (28) (22) (29) (14) (22) (81)	81 SFASNSV -- SPAD RENMTMAGT KTKG --- N A D C K P REAS N ELSK RHDEGY N KGPNPPNTGVLDCYVAGM WOND TIGHEANFSIGRITW VWD CTHVPEUVEREIK ACORHDEGY N QVO TGADLFRRELLQONTRY TREL OGTANASA --- T W D S E S Y S E P L S H E S A N R H D F G Y N A LFHRGGHGRPHIETIHTYPOQEPANAQG --- T W D C S S P D F S A D F S P H R H D F G Y N Q PIBLQASITTCSAKANHREKUTOK KAKA --- KCNHDNEK PERKDENEIS SORHDEGY NT ATW PJKRONDVLYVNGVACG TSNNHSIE P -- R W H D C S F M E L 3 P H C H R D E G Y O N E I EAQTPKEDRQDITV S S W C O T T R E N T S S N D D C T E N E F S E H A R H D E G Y H E R A AAS VAA S S TD L J S I S L P F AR NKNPA LDWSSDGCS SPDNP GFPFLPAC RHDEGYRNYKKO		
SEC ID NO: 1 SEC ID NO: 10 SEC ID NO: 8 SEC ID NO: 4 SEC ID NO: 5 SEC ID NO: 7 SEC ID NO: 12 SEC ID NO: 3	(158) (157) (122) (105) (99) (106) (91) (99)	161 HOFTEA HK D D F H E N E A G G L E S K K D K E N T I D V E F W L R F P P E K C D F E M E N E A R G L O S K K D K E N T I D V E F W L P H E P R A M K E L L E B I L E N K E N G N --- I F N C H E A H Y V W E C S O T T O N T L K D G E T G Y C O T G --- Y S T C H A N Y A V E E R T K G E L Q E Y D L L A H Y N E L V A E A I A K G N E K L A P A A D D I T T E R V N O N T E N -- I F T R A C R M A D I V E E U D E F S K R K R A E A L A R Q M E E N V A K A K I T T K A M K E D A H E M K I S O F G M S S K K E E R P R A A G V I T V O H E R K D E A L E F D P V E F E K R D E V A D Q P D E S A T I O N A L I D K E E H D O G I J A V E C A A G V I P A V A F G G D A T P G R M H V A V F G O T Q A E H D A L V I T F F E S G L I E N E F T R F E Q S S S V R C V N A V S V A M G G D D A T P G --- K R D E H S E L V G I R F T E A N K R I D D N F K D L Y Q C H S W G V A C R A L A D V Y A W T F G		
SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 10 SEQ ID NO: 8 SEQ ID NO: 4 SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 3	(212) (211) (197) (180) (170) (186) (166) (165)	241 294 240		

241

294

240

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.